

METHOD OF DETERMINING HLA-DP TYPE**Publication number:** JP6078800**Publication date:** 1994-03-22**Inventor:** AN BII BEGOBITSUCHI; TEODORIKA ERU BUGAWAN;
HENRII EE AARITSUHI**Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE**Classification:****- international:** **C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68;** (IPC1-7): C12Q1/68; C12N15/10; C12N15/11; C12Q1/68**- european:** C12Q1/68M4**Application number:** JP19930151817 19930623**Priority number(s):** US19920903028 19920623**Also published as:**

EP0575845 (A2)

EP0575845 (A3)

Report a data error here

Abstract not available for JP6078800

Abstract of corresponding document: **EP0575845**

A process for determining an individual's HLA DP genotype from a nucleic acid containing sample obtained from the individual, which process comprises: (a) amplifying a target region of the nucleic acids in the sample under conditions suitable for carrying out a polymerase chain reaction, whereby the target region contains a polymorphic region (variable segment) of an HLA DP gene using a specific primer; (b) mixing the amplified nucleic acids with a panel of sequence specific oligonucleotide (SSO) probes, wherein each probe is complementary to a variant sequence of a variable segment of an HLA DP gene, under conditions wherein SSO probes bind to said amplified nucleic acids to form stable hybrid duplexes only if they are exactly complementary; and (c) detecting hybrids formed between the amplified nucleic acids and the SSO probes. The invention also relates to the said primers per se, to kits comprising said oligonucleotide primers and to oligonucleotide probes useful in HLA-DP DNA typing methods. These HLA-DP DNA typing methods may be useful in the prevention of graft rejection and graft versus host disease, in determining susceptibility to autoimmune diseases, in providing evidence concerning the derivation from an individual of forensic samples, and in paternity testing.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Family list**8** family members for:**JP6078800**

Derived from 6 applications.

[Back to JP6078800](#)

- 1 Method for HLA-DP typing**
Publication info: **AU675431B B2** - 1997-02-06
- 2 Method for HLA-DP typing**
Publication info: **AU4142293 A** - 1994-01-06
- 3 METHOD FOR HLA-DP TYPING**
Publication info: **CA2098947 A1** - 1993-12-24
- 4 Method for HLA-DP typing.**
Publication info: **EP0575845 A2** - 1993-12-29
EP0575845 A3 - 1998-01-07
- 5 METHOD OF DETERMINING HLA-DP TYPE**
Publication info: **JP3417601B2 B2** - 2003-06-16
JP6078800 A - 1994-03-22
- 6 METHOD AND KIT FOR DETERMINING AN INDIVIDUALS HLA (HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN)-DP GENOTYPE USING GENE AMPLIFICATION**
Publication info: **NZ247935 A** - 1995-08-28

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-78800

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 3 月 22 日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	7823-4B		
	Z	7823-4B		
C 1 2 N 15/10				
15/11				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求	請求項の数22(全 60 頁)

(21) 出願番号	特願平5-151817	(71) 出願人	592085104 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アクチエン ゲゼルシャフト F. HOFFMANN-LA ROCHE AKTIENGESELLSCHAFT スイス国, ツューハー-4002 パーゼル, グレンツァハーシュトラッセ 124
(22) 出願日	平成 5 年 (1993) 6 月 23 日	(72) 発明者	アン ビー. ベゴビッチ アメリカ合衆国, カリフォルニア 94530, エル セリト, ロックウェイ アベニュー 7306
(31) 優先権主張番号	9 0 3 0 2 8	(74) 代理人	弁理士 宇井 正一 (外 4 名)
(32) 優先日	1992 年 6 月 23 日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HLA-DP 型決定法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は個体から得られた核酸含有試料から個体のHLA-DP遺伝子型を決定する方法、該方法で使われるオリゴヌクレオチドプライマーそれ自体、前記オリゴヌクレオチドプライマーを含んで成るキット、およびHLA-DP型決定法において有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供する。

【効果】 本発明のHLA-DP型決定法は、移植片拒絶および対宿主性移植片病の防止、自己免疫疾患に対するかかりやすさの決定、法医学的試料の個体起源に関する証拠の提出、並びに実父確定試験において有用であろう。

【特許請求の範囲】

* 決定する方法であって、

【請求項1】 HLA-DP遺伝子型を決定しようとする個体

(a) 次のプライマー:

から得られた核酸含有試料から個体のHLA DP遺伝子型を*

【表1】

AB111 配列番号: 91 5'GGGATCCGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT,

RS348 配列番号: 142 5'ACACAGGAAACAGCTATGACCATG,及び

RS349 配列番号: 143 5'CCAGGGT'TTTCCCAGTCACGAC;

から成る群から選ばれたプライマーを使って、ポリメラーゼ連鎖反応を実施するのに適当な条件下で前記試料中の核酸の標的領域を増幅せしめ、ここで前記標的領域はHLA DP遺伝子の多形性領域(可変セグメント)を含み;

(b) 両者が正確に相補的である場合にのみ配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO)プローブが前記増幅された核酸と結合して安定なハイブリッド二本鎖を形成するような条件下で、前記増幅された核酸をSSOプローブのパネルと混合し、ここで各プローブはHLA DP遺伝子の可変セグメントの変異体配列に相補的であり;そして

(c) 前記増幅された核酸と前記SSO プローブとの間で形成されたハイブリッドを検出する;ことを含んで成る方法。

【請求項2】 前記パネルのプローブが、

【表2】

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTAAGT);
 配列番号: 99 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGA);
 配列番号: 100 (5'ATTACGTGTACCACTTACG);
 配列番号: 101 (5'CGTCCCTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 102 (5'CCTGCTGCGGAGTACTG);
 配列番号: 103 (5'CAGTACTCCTCATCAGG);
 配列番号: 104 (5'CAGTACTCCGCCTCAGG);
 配列番号: 105 (5'CCTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 106 (5'GACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 107 (5'GCTCCTCCTCCAGGATGTC);
 配列番号: 108 (5'GACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 109 (5'GCTCCTCCTCCAGGAGGTC);
 配列番号: 110 (5'ATTACGTGCACCACTTACG);
 配列番号: 111 (5'CGTAACTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 112 (5'CTGCAGGGTCATGGGCCCCCG);
 配列番号: 113 (5'CTGCAGGGTCACGGCCTCGTC);
 配列番号: 114 (5'ATTACGTGTACCACTTA);
 配列番号: 115 (5'CCTGAGGCGGAGTACTG);
 配列番号: 116 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAG);
 配列番号: 117 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGG);
 配列番号: 118 (5'CTGGTCGGGCCCCATGACC);
 配列番号: 119 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGAC);
 配列番号: 120 (5'TTACGTGTACCTGGGAC);
 配列番号: 121 (5'ACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 122 (5'ACATCCTGGAGGAGGAGC);

【表3】

配列番号: 123 (5'ACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 10 配列番号: 124 (5'CCTGATGAGGAGTACTG);
 配列番号: 125 (5'CTGGGCGGGCCCATG);
 配列番号: 126 (5'CTGGACGAGGCCGTG);
 配列番号: 127 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAGC);
 配列番号: 128 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGGC);
 配列番号: 129 (5'AGCTGGGCGGGCCCATGAC);
 配列番号: 130 (5'AGCTGGACGAGGCCGTGAC);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCACTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCACTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 20 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCGCGCGCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCGTGCGCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA);及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA);

30 から成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記パネルのプローブが、

【表4】

40

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCGCGCGCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCGTGCGCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTGGGCCCCA)

から成る群から選ばれる、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記個体のHLA DP遺伝子型が、DPB21, D PB22, DPB23, DPB24, DPB25, DPB26, DPB27, DPB28, DP B29 およびDPB30 から成る群から選ばれた対立遺伝子を含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 自己免疫疾患への個体のかかりやすさを決定する方法であって、請求項1に記載の方法に従って個体のHLA DP遺伝子型を決定し、そして前記個体の遺伝子型が自己免疫疾患に関連する遺伝子型であるかどうかを決定することを含んで成る方法。

【請求項6】 前記自己免疫疾患が少数関節性幼年性慢性関節リウマチであり、そして自己免疫疾患に関連する遺伝子型がDPB2.1対立遺伝子を含んで成る、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記自己免疫疾患がIDDMである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記自己免疫疾患がCDであり、そして自己免疫疾患に関連する遺伝子型がDPB13, DPB1, DPB3 およびDPB4.2から成る群から選ばれた対立遺伝子を含んで成る、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 ゲノム核酸を含有する試料の起源に関する法医学的証拠を提供する方法であって、請求項1に記載の方法に従って前記試料のHLA DP遺伝子型および容疑者のHLA DP遺伝子型を決定し、前記容疑者と前記試料のHLA DP遺伝子型を比較し、そして前記試料が前記容疑者から派生し得たのかどうかを推測することを含んで成る方法。

【請求項10】 前記プローブのパネルが、ハイブリダイズ領域を有するプローブ;

【表5】

配列番号: 88 (5'TGTCTGCACATCCTGTCCG);
 配列番号: 89 (5'TGTCTGCATACCCTGTCCG);
 配列番号: 90 (5'CGGACAGGATATGCAGACA);
 配列番号: 99 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGA);
 配列番号: 101 (5'CGTCCCTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 102 (5'CCTGCTGCGGAGTACTG);
 配列番号: 105 (5'CCTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 106 (5'GACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 107 (5'GCTCCTCCTCCAGGATGTC);
 配列番号: 108 (5'GACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 110 (5'ATTACGTGCACCAGTTACG);
 配列番号: 112 (5'CTGCAGGGTCATGGCCCCCG);
 配列番号: 114 (5'ATTACGTGTACCAGTTA);
 配列番号: 115 (5'CCTGAGGCGGAGTACTG);
 配列番号: 116 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAG);
 配列番号: 117 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGG);
 配列番号: 126 (5'CTGGACGAGGCCGTG); 及び
 配列番号: 131 (5'CCAGTACTCCTCATCAGGC)

を含んで成る、請求項1に記載の方法。

【請求項11】 前記プローブのパネルが、ハイブリダイズ領域を有するプローブ: 配列番号92 (5' CCTGATGAGGTGTACTG) を更に含んで成る、請求項10に記載の方法。

【請求項12】 使用するプローブが

UG19 配列番号 144 (GCTGCAGGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT) および

UG21 配列番号 145 (CGGATCCGGCCCAAGCCCTCACTC)

である、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 次の群:

【表6】

5

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCGCGCGCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCGTGCGCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA)

*

AB111 配列番号: 91 5'GGGATCCGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT,
 RS348 配列番号: 142 5'ACACAGGAAACAGCTATGACCATG、及び
 RS349 配列番号: 143 5'CCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

から成る群から選ばれたプライマー。

【請求項15】 診断用具としての請求項13に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項16】 診断用具としての請求項14に記載のプライマー。

【請求項17】 SS0 プローブのパネルであって、前記プローブのパネルが次の群:

【表8】

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCGCGCGCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCGTGCGCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA)

から選ばれる、SS0 プローブのパネル。

【請求項18】 個体のHLA DP遺伝子型を決定するために使われる請求項13に記載のオリゴヌクレオチドプローブ、請求項14に記載のプライマーまたは請求項17に記載のSS0 プローブのパネル。

【請求項19】 個体のHLA DP遺伝子型を決定するために使われ、ここで前記個体のHLA DP遺伝子型がDPB21, DPB22, DPB23, DPB24, DPB25, DPB26, DPB27, DPB28, DPB29およびDPB30 から成る群から選ばれた対立遺伝子を含んで成る、請求項13に記載のオリゴヌクレオチドプローブ、請求項14に記載のプライマーまたは請求項17

6

*から選ばれたオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項14】 次のプライマー:

【表7】

10

に記載のSS0 プローブのパネル。

【請求項20】 個体のHLA DP遺伝子型を決定するのに有用なキットであって、

(a) SS0 プローブのパネルであって、次の群:

【表9】

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCGCGCGCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCGTGCGCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA);

から成る群から選ばれるSS0 プローブのパネル; 並びに
 (b) キット成分を利用することにより遺伝子型を決定するための使用説明書を含んで成るキット。

【請求項21】 前記個体のHLA DP遺伝子型がDPB21, DPB22, DPB23, DPB24, DPB25, DPB26, DPB27, DPB28, DPB29およびDPB30 から成る群から選ばれた対立遺伝子を含んで成る、請求項20に記載のキット。

【請求項22】 HLA DP遺伝子の標的領域の増幅に有用なオリゴヌクレオチドプライマーを含む容器を更に含んで成り、前記標的領域が前記可変セグメントを含有する、請求項20に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、米国特許第 4,683,195

号および同第 4,683,202号に開示されたような遺伝子増幅方法論並びに米国特許第 4,683,194号に開示されたようなドットプロットおよび対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ技術を使って個体のHLA-DP遺伝子型を決定する方法およびそのための組成物に関する。本発明の方法およびプローブは、具体的には、多形性クラスII HLA-DP 遺伝子の検出に関する。本発明は分子生物学、診断医学および法医学の分野に関する。

【0002】

【従来の技術】後述する本発明の理解を助けるために、国際特許出願公開第 W0 89/11547号の序論部分を参考にする。そこには上記分野における序論が与えられており、その中で使われる用語の定義は本明細書で使用する用語の定義と同じである。

【0003】W0 89/11547 は、個体から得られた核酸含有試料から個体のHLA-DP遺伝子型を決定する方法を開示しており、該方法は、(a)HLA-DP 遺伝子の多形性領域を含む前記核酸の標的領域を増幅せしめ；(b) 前記増幅された核酸中に相補的配列が含まれる場合にのみ配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO) プローブの各々が前記増幅された核酸と安定なハイブリッド二本鎖を形成するのを可能にする条件下で、前記増幅された核酸をHLA-DP遺伝子の可変セグメントに特異的な SSOプローブのパネルとハイブリダイズせしめ；そして(c) 前記増幅された核酸と前記 SSOプローブとの間で形成されたハイブリッドを検出することを含んで成る。

【0004】W0 89/11547 は個体のHLA-DP遺伝子型を決

AB111 配列番号：91 5'GGGATCCGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT,
RS348 配列番号：142 5'ACACAGGAAACAGCTATGACCATG,及び
RS349 配列番号：143 5'CCAGGGTTTTCACAGTCACGAC;

【0008】から成る群から選ばれたプライマーを使って、ポリメラーゼ連鎖反応を実施するのに適当な条件下で前記試料中の核酸の標的領域を増幅せしめ、ここで前記標的領域はHLA DP遺伝子の多形性領域（可変セグメント）を含み；両者が正確に相補的である場合にのみ配列特異的オリゴヌクレオチド(SSO) プローブが前記増幅された核酸と結合して安定なハイブリッド二本鎖を形成するような条件下で、前記増幅された核酸を SSOプローブのパネルと混合し、ここで各プローブはHLA DP遺伝子の可変セグメントの変異体配列に相補的であり；そして前記増幅された核酸と前記SSO プローブとの間で形成されたハイブリッドを検出することを含んで成る。

【0009】前記プローブは、好ましくは次の群：

【表11】

定するのに有用なキットも記載しており、それらのキットは、(a) 前記標的領域中の対立遺伝子変異体配列のためのSSO プローブのパネル；および(b) キット成分を利用することにより遺伝子型を決定するための使用説明書を含んで成る。

【0005】本発明は、個体から得られた核酸含有試料から個体のHLA-DP遺伝子型を決定するための改善された方法および試薬を提供する。本発明は、HLA-DPB1対立遺伝子の可変第二エクソン中の更なる配列多形性の発見と特徴づけに起因する。結果として、更なるDPB1 (DPベータ) 対立遺伝子変異体、すなわち後述する対立遺伝子DPB21, DPB22, DPB23, DPB24, DPB25, DPB26, DPB27, DPB28, DPB29 およびDPB30 が発見された。

【0006】それらのDP遺伝子の新規配列に基づいて、変異体遺伝子型の検出のためのSSOプローブの配列が提供される。異なるDP対立遺伝子間の変異は分散される。従って、1つのプローブだけがまれに特定のDPB1対立遺伝子を一樣に同定することができる。対立遺伝子の同定は、むしろ、各プローブがDPB1遺伝子の種々のセグメントに特異的なものであるプローブのパネルの結合パターンから推測される。

【0007】より詳しくは、本発明は、HLA-DP遺伝子型を決定しようとする個体から得られた核酸含有試料から個体のHLA DP遺伝子型を決定する方法に関し、該方法は、次のプライマー：

【表10】

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 99 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGA);
 配列番号: 100 (5'ATTACGTGTACCAGTTACG);
 配列番号: 101 (5'CGTCCCTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 102 (5'CCTGCTGCGGAGTACTG);
 配列番号: 103 (5'CAGTACTCCTCATCAGG);
 配列番号: 104 (5'CAGTACTCCGCCTCAGG);
 配列番号: 105 (5'CCTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 106 (5'GACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 107 (5'GCTCCTCCTCCAGGATGTC);
 配列番号: 108 (5'GACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 109 (5'GCTCCTCCTCCAGGAGGTC);
 配列番号: 110 (5'ATTACGTGCACCAGTTACG);
 配列番号: 111 (5'CGTAACTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 112 (5'CTGCAGGGTCATGGGCCCCCG);
 配列番号: 113 (5'CTGCAGGGTCACGGCCTCGTC);
 配列番号: 114 (5'ATTACGTGTACCAGTTA);
 配列番号: 115 (5'CCTGAGGCGGAGTACTG);
 配列番号: 116 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAG);
 配列番号: 117 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGG);
 配列番号: 118 (5'CTGGTGGGCCCCATGACC);
 配列番号: 119 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGAC);
 配列番号: 120 (5'TTACGTGTACCTGGGAC);
 配列番号: 121 (5'ACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 122 (5'ACATCCTGGAGGAGGAGC);

【表12】

配列番号: 123 (5'ACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 124 (5'CCTGATGAGGAGTACTG);
 配列番号: 125 (5'CTGGGCGGGCCCATG);
 配列番号: 126 (5'CTGGACGAGGCCGTG);
 配列番号: 127 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAGC);
 配列番号: 128 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGGC);
 配列番号: 129 (5'AGCTGGGCGGGCCCATGAC);
 配列番号: 130 (5'AGCTGGACGAGGCCGTGAC);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCCGCGCCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCTGCGCCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA).

から成る群から選ばれる。

【0010】より好ましくは、それらは次の核酸配列を

AB111 配列番号: 91 5'GGGATCCGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT,
 RS348 配列番号: 142 5'ACACAGGAAACAGCTATGACCATG, 及び
 RS349 配列番号: 143 5'CCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

有する新規プローブ:

【表13】

配列番号: 92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG);
 配列番号: 132 (5'ATTACGTGCACCAGTTAC);
 配列番号: 133 (5'ATTACGTGCACCAGTTA);
 配列番号: 134 (5'CAGTACTCCTCATCAG);
 配列番号: 135 (5'CTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 137 (5'CCGTCCCTGGAAAAGGTAATTC);
 配列番号: 138 (5'GACCTCCTGNGAGGAGAGGC);
 配列番号: 139 (5'GACCTCCTGGAGNGAGGAGC);
 配列番号: 151 (X-AGGAGTTCCGCGCCTT);
 配列番号: 152 (X-AGGAGTTCTGCGCCTT);
 配列番号: 153 (X-AGGAGCTCGTGCCTTC);
 配列番号: 154 (X-CCGGCAGGAGTACGCGC);
 配列番号: 155 (X-GAGGAGTACGCGCGCT);
 配列番号: 156 (X-CGAGCTGGGCGGGCCCA); 及び
 配列番号: 157 (X-CGAGCTGGTCCGGGCCCA)

の群から選ばれる。

【0011】本発明に従った好ましい方法では、プローブのパネルはハイブリダイズ領域を有するプローブ:

20 【表14】

配列番号: 88 (5'TGTCTGCACATCCTGTCCG);
 配列番号: 89 (5'TGTCTGCATACCCTGTCCG);
 配列番号: 90 (5'CGGACAGGATATGCAGACA);
 配列番号: 99 (5'GAATTACCTTTTCCAGGGA);
 配列番号: 101 (5'CGTCCCTGGTACACGTAAT);
 配列番号: 102 (5'CCTGCTGCGGAGTACTG);
 配列番号: 105 (5'CCTGATGAGGACTACTG);
 配列番号: 106 (5'GACATCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 107 (5'GCTCCTCCTCCAGGATGTC);
 配列番号: 108 (5'GACCTCCTGGAGGAGAAGC);
 配列番号: 110 (5'ATTACGTGCACCAGTTACG);
 配列番号: 112 (5'CTGCAGGGTCATGGGCCCCCG);
 配列番号: 114 (5'ATTACGTGTACCAGTTA);
 配列番号: 115 (5'CCTGAGGCGGAGTACTG);
 配列番号: 116 (5'GACCTCCTGGAGGAGGAG);
 配列番号: 117 (5'GACCTCCTGGAGGAGAGG);
 配列番号: 126 (5'CTGGACGAGGCCGTG); 及び
 配列番号: 131 (5'CCAGTACTCCTCATCAGGC).

を含んで成る。

【0012】最も好ましくは、前記プローブのパネルがハイブリダイズ領域を有するプローブ: 配列番号92 (5'CCTGATGAGGTGTACTG) を更に含んで成る。本発明は、特に診断用具として使用する時、例えば個体のHLA DP遺伝子型を決定するために、例えば個体のHLA DP遺伝子型がDPB21, DPB22, DPB23, DPB24, DPB25, DPB26, DPB27, DPB28, DPB29 およびDPB30 から成る群から選ばれた対立遺伝子を含んで成る場合に、新規プライマー:

【表15】

および上述の新規プローブそれ自体にも関する。

【0013】本発明は増幅された核酸にも適合でき、そしてPCR技術が非常に少量の核酸を増幅することができるため、極少量の核酸を含む試料を本発明の方法により特定のHLA-DP変異体の存在について型決定することができる。例えば、Higuchiら、1988, *Nature* 332: 543-546により記載されたDQアルファを使った研究により証明されるように、一本の毛髪でさえ、本発明の目的に十分な量のDNAを含有する。

【0014】一般に、試料中の核酸はDNAであり、最も普通にはゲノムDNAであろう。しかしながら、本発明は他の核酸、例えば伝令DNAまたはクローン化DNAを使って実施することもでき、試料中の核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよく、そして本発明の目的に適當であろう。当業者は、どんな性質の核酸であっても、単に本発明の方法の適切な段階に適當な処置をとることによって、核酸を本発明の方法により型決定することができる。PCRを使って試料中の核酸を増幅せしめる時、本発明の新規プローブを使って型決定する時の試料は通常二本鎖DNAを含有するだろう。

【0015】上述したように、本発明のHLA-DP型決定法およびプローブは、PCRで増幅された標的DNAと共同して使用される。しかしながら、本発明を実施する者は、標的配列がSSOプローブとの核酸ハイブリダイゼーションにより検出できるように十分な増幅を提供する任意の既知の方法によって試料中のHLA-DP標的配列の増幅を行ってもよいことに気づくべきである。PCR法は当業界で周知であり（米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）、そして様々な販売業者、例えばPerkin Elmer (Norwalk, CT)がPCR試薬を販売しPCRプロトコルを公表しているけれども、PCR法をよく知らない人々に対する本発明の明確化と十分な理解のために、幾つかの一般的なPCR情報を下記に提供する。

【0016】試料中の標的核酸配列をPCRにより増幅せしめるためには、該配列が増幅系の成分に近づきやすくなければならない。一般に、この近づきやすさは試料から核酸を単離することによって保証される。生物学的試料から核酸を抽出する様々な技術が当業界で公知である。例えば、Maniatisら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)に記載された技術を参照のこと。あるいは、試料がかなり容易に崩壊され得る場合には、PCR法による増幅前に核酸を精製する必要はなく、即ち試料が細胞、特に末梢血リンパ球または羊膜細胞から成る場合は、単に高張緩衝液中に細胞を懸濁することによって細胞内成分の溶解および分散を達成することができる。

【0017】PCR法を開始するために試料中の核酸をまず変性せしめる（試料の核酸が二本鎖であると仮定す

る）ため、そしてある試料では単純に加熱することが細胞の破壊をもたらすため、時には試料からの核酸の単離を鎖分離と一緒に行うことができる。鎖分離は物理的、化学的または酵素的手段を含む任意の適當な変性方法によって行うことができる。典型的な熱変性は、約1~10分間の時間約80℃~105℃の温度を伴う。

【0018】鎖分離は、ヘリカーゼ活性を示すことができる酵素であるヘリカーゼによって誘導することもできる。例えば、酵素RecAはATPの存在下でヘリカーゼ活性を有する。ヘリカーゼによる鎖分離に適當な反応条件は当業界で公知である（Kuhn Hoffman-Berling, 1978, *CS H-Quantitative Biology* 43:63、および Radding, 1982, *Ann. Rev. Genetics* 16:405-436を参照のこと）。

【0019】上述したように、鎖分離は試料核酸の単離と一緒にまたは別々の段階として行うことができる。PCR法のこの態様では、反応は熱安定性ポリメラーゼにより触媒され、高温で実施される。反応温度は、前記酵素が熱安定性であり、且つ核酸が一本鎖と二本鎖の平衡状態にあり、その結果十分なプライマーが鋳型鎖にアニールして妥当な重合速度を可能にするような温度である。しかしながら、PCR法の好ましい態様では、鎖分離は、二本鎖の変性を引き起こすがポリメラーゼの不可逆的な変性を引き起こさない効果的な時間の間、反応液を十分に高い温度に加熱することにより達成される（欧州特許出願公開第258,017号を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

【0020】一度鎖が分離されれば、PCRの次の段階は、分離された鎖を標的配列に隣接するプライマーとハイブリダイズせしめることを含む。次いで該プライマーを伸長して標的鎖の相補的コピーを形成させ、そして変性、ハイブリダイゼーションおよび伸長のサイクルを、所望の量の増幅核酸を得るのに必要な回数だけ繰り返す。

【0021】上述したように、本発明はHLA-DP DNAの増幅および型決定のためのPCR新規プライマーも提供する。それらのプライマーは、HLA-DP遺伝子座の変異領域中の標的配列に隣接する保存領域内の配列に相補的である。本発明の目的上、好ましいHLA-DP遺伝子座の変異領域はDPA1およびDPB1遺伝子の第二エクソンである。好結果のPCR増幅のために、本発明のプライマーは、各プライマーが二本鎖配列に沿ってハイブリダイズする位置が、一方のプライマーから合成される伸長生成物とその鋳型（相補鎖）から分離された時に他方のプライマーの伸長のための鋳型として働くような位置であるように、デザインされる。

【0022】更に、選択的アニリング条件下でHLA-DP領域に優先的に結合するであろうプライマーが提供される。好ましいプライマーは次のものである：

【表16】

UG19 配列番号: 144 (GCTGCAGGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT) 及び
UG21 配列番号: 145 (CGGATCCGGCCCAAAGCCCTCACTC).

【0023】PCRにおけるプライマーの鋳型依存性伸長は、適当な塩、金属カチオンおよびpH緩衝系から成る反応媒質中で適量の4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dATP, dGTP, dCTP, およびdTTPまたはdUTP) の存在下で重合剤により触媒される。適当な重合剤は、鋳型依存性DNA合成を触媒することが知られている酵素である。例えば、鋳型がRNAならば、RNAを相補的DNA (cDNA) 配列に変換する適当な重合剤は逆転写酵素 (RT)、例えばトリ骨髄芽球症ウイルスRTである。

【0024】増幅の標的がDNAである場合、適当なポリメラーゼとしては、例えばE. コリDNAポリメラーゼIまたはそのクレノウ断片、T₄ DNAポリメラーゼ、およびサーマス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) から単離されPerkin Elmer (Norwalk, CT) から市販されている熱安定性DNAポリメラーゼであるTaqポリメラーゼが挙げられる。最後の酵素は核酸の増幅と配列決定に広く使われている。DNAポリメラーゼを使用する時の反応条件は当業界で既知であり、例えば、論文 *Methods in Enzymology* およびManiatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (前掲) 中に記載されている。

【0025】PCR法は、各段階の後で新たな試薬を添加する段階形式において、または全試薬を同時に添加する形式において、または一定数の段階の後で新たなもしくは異なる試薬を添加する部分的段階形式において、実施することができる。例えば、鎖分離が熱により誘導されそしてポリメラーゼが熱感受性であるならば、各ラウンドの鎖分離の後にポリメラーゼを添加しなければならないだろう。しかしながら、変性にヘリカーゼを使用する場合または伸長に熱安定性ポリメラーゼを使用する場合には、全試薬を最初に添加することができ、あるいはまた、試薬のモル比が反応にとって重要である場合には、それらの試薬が合成反応により消耗された時に定期的に試薬を補充することができる。

【0026】PCR法による可能な莫大な増幅のため、別の試料、正の対照の鋳型または前の増幅から得られた少量のDNAが、鋳型DNAの添加なしでさえも、PCR生成物をもたらすのに十分な鋳型を提供する。可能なら、PCR生成物の分析および試料調製とは別の領域中に全反応混合物が容易される。RNA/DNA調製、反応液の混合および試料分析への精巧なまたは使い捨ての容器、溶液またはピペット (好ましくは容量ピペットまたは差し込み型ピペットチップ) の使用は、相互汚染を最小にするだろう。Higuchi およびKwok, 1989, *Nature* 339: 237-238、並びにKwokおよびOrrego, Innis ら編, 1990, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA

(これらは参考として本明細書中に組み込まれる) も参照のこと。

【0027】核酸増幅の相互汚染の影響を最小にする1つの特定方法は、国際特許出願公開第 W0 92/01814号に記載されており、これは参考として本明細書中に組み込まれる。この方法は、普通でないヌクレオチド塩基、例えばdUTPを増幅生成物中に導入することを含む。酵素的および/または物理化学的処理への増幅生成物の暴露が、該生成物を次の増幅のための鋳型として働くことのできないDNAにする。例えば、ウラシル-DNAグリコシラーゼは、ウラシル塩基を含むPCR生成物からウラシル残基を除去するだろう。増幅前のPCR反応混合物の酵素処理は、前の反応からの任意の汚染ウラシル含有PCR生成物の分解を引き起こし、そして増幅反応を「安定化」する作用をする。

【0028】プライマーと鋳型の両方を添加した後で反応混合物に熱安定性DNAポリメラーゼを添加することが好ましいが、必須ではない。プライマー伸長に不可欠である少なくとも1つの成分を分離することにより、重合の開始を調節することができ、且つ非特異的なプライマーハイブリダイゼーションと伸長を最小にすることができる。重合の開始は、MgCl₂ の添加を遅らせることによって調節することができる。

【0029】「ホットスタート」と称するPCRの変形が国際特許出願公開第 W0 91/12342号に記載されている (これは参考として本明細書中に組み込まれる)。ホットスタートPCRでは、最初の高温変性段階までポリメラーゼの添加が遅延され、それによって全反応成分を室温で添加した場合に起こり得る非特異的なプライマーハイブリダイゼーションからの伸長生成物の形成を最小にする。

【0030】当業者は、PCR法が通常は熱安定性酵素を使って自動化された方法として実施されることを知っているだろう。この方法では、反応混合物が変性領域、プライマーアニーリング領域および反応領域を通して循環される。熱安定性酵素の使用に合わせて特別に改造された機械は、欧州特許出願公開第 236,069号 (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により詳細に開示されており、そしてPerkin Elmer (Norwalk, CT) から市販されている。

【0031】上述したように、本発明の方法においてPCR法が重要である1つの理由は、HLA-DP DNA型決定前にPCR法を使って試料核酸を増幅できることである。しかしながら、本発明の目的上のPCRのもう1つの重要な使用目的は、HLA-DP領域中に存在する以前に発見されていない対立遺伝子変異体のヌクレオチド配列を決定し、その結果それらの変異体のためのプローブを作製し本発明で使用するができるようにするためである。

【0032】PCRのこの使用目的においては、DPA1とDPB1遺伝子の多形性領域を増幅せしめ、それらの多形性標的領域、例えばDPA1およびDPB1遺伝子の第二エクソンのヌクレオチド配列を決定する。下記に説明するように、血清学的型決定、混合リンパ球型決定、または感作リンパ球型決定により型決定しようとする特定の変異体を含む細胞を、従来技術の方法により確立されたDP型を有する特定の変異体のヌクレオチド配列と関連づけることも有用である。

【0033】DP変異体対立遺伝子の標的領域のヌクレオチド配列の分析は、PCR生成物の直接分析によって容易に実施することができる。好ましい配列決定プロトコールは、Innis ら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:9436-9440および米国特許第5,075,216号（これらは参考により本明細書中に組み込まれる）に記載されている。PCR増幅生成物の直接分析方法はSaiki ら、1988、Science 239: 489-491によっても記載されている。あるいは、増幅された標的配列を、Scharfら、1986、Science 233:1076-1078 により記載されたようにして配列分析前にクローニングしてもよい。

【0034】W0 89/11547 において論じられたように、多数の異なるハプロタイプを表すDPw 型の細胞のパネルがPCRとDPB1遺伝子の第二エクソンのヌクレオチド配列決定により分析されている。自己免疫疾患にかかっている様々な個体から得られた試料を使ったこの努力および同様な努力の結果として、この遺伝子座における多数の異なる対立遺伝子変異体が発見された。

【0035】一般に、この結果は特定のDPB1配列が標準的PLT 限定DPw1~DPw6特異性と関係があることを証明した。まれな例外が標準的で且つ再現性を有するPLT DPw 型決定方法を得ることの難しさを反映し、この難しさが本発明の方法の利点を強調する。この点で、それは最初にDPw1として型決定された細胞系Cox がDPw3と再度型決定され、DPB3対立遺伝子（現在DPB1* 0301、新命名法はどこかに記載される）を含むことに関係がある。

【0036】よって、本発明は、自己免疫疾患への個体のかかりやすさを決定する方法であって、本発明の方法に従って個体のHLA DP遺伝子型を決定し、そして前記個体の遺伝子型が自己免疫疾患に関連する遺伝子型であるかどうかを決定することを含んで成る方法にも関する。前記自己免疫疾患は、例えば少数関節性幼年性慢性関節リウマチおよびインスリン依存性糖尿病（IDDM）の場合には、DPB2.1対立遺伝子に関連づけられ、または例えばセリアック病（CD）の場合にはDPB13、DPB1、DPB3 およびDPB4.2から成る群から選ばれた対立遺伝子に関係づけられる。

【0037】血清学的に限定されたDP型とDP変異体ヌクレオチド配列との間の他の興味ある重要な関係並びにDPA1（以前はDPアルファ）遺伝子座およびDPB1（以前はDPベータ）遺伝子座に関するHLA-DNA 型決定の実施方法の

説明については、W0 89/11547 を参照のこと。

【0038】DPA1およびDPB1遺伝子のDNA配列は、本発明の配列特異的オリゴヌクレオチドプローブのデザインにおける有用な出発点として働く。それらのプローブは、緊縮ハイブリダイゼーション条件下で、プローブがDPA1およびDPB1対立遺伝子の可変セグメント中の正確に相補的な配列にのみ特異的にハイブリダイズするようにデザインされる。

【0039】それらのSSOプローブは可変領域中の変異体配列に渡り且つ配列特異的ハイブリダイゼーションを考慮に入れた任意の長さのものであることができるが、好ましくはプローブのハイブリダイズ領域が短く、長さが10~30塩基、より好ましくは約17~19塩基である。固定化のために、プローブがポリTの長鎖を含んでもよく、照射により固体支持体に固定化せしめることができ、固定化の技術は国際特許出願公開第 W0 89/11548号および欧州特許出願公開第 237,362号中により詳細に記載されている。それらの出願の開示は参考として本明細書中に組み込まれる。

【0040】本発明のSSOプローブは、DP対立遺伝子の特定の変異体セグメントと特異的にハイブリダイズし且つ前記特定のセグメントについて既知である他の変異体配列と不安定化ミスマッチを有するようにデザインされる。好ましくは、該プローブはDPB1およびDPA1遺伝子の可変第二エクソン中の変異体DNAセグメントに特異的であり、更により好ましくは、該プローブは第二エクソンの8-11, 36, 55-57, 65-69, 76および84-87 位近くの残基をコードするDNAセグメントに特異的である。DPA1およびDPB1対立遺伝子の第二エクソンに特異的にハイブリダイズするようにデザインされたオリゴヌクレオチドプローブについては、下記と実施例においてより詳細に記載する。

【0041】本発明のプローブは、PCRプライマーの説明のところで上述した技術を使って合成しそして標識することができる。例えば、プローブを³²P-ATP とキナーゼと共にインキュベートすることにより、プローブを5'末端のところで³²Pにより標識することができる。SSO プローブのための適当な非放射性標識は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)である。

【0042】この標識を含むプローブの調製および検出方法は下記の実施例と欧州特許出願公開第 237,362号（これは参考により本明細書中に組み込まれる）に記載されている。そのような標識プローブの使用に関する追加の情報については、米国特許第 4,789,630号；Saiki ら、1988、N. Eng. J. Med. 319:537-541；およびBugawan ら、1988、Bio/Technology 6:943-947 を参照のこと（これらは参考により本明細書中に組み込まれる）。有用な色素原としては赤色ロイコ色素とテトラメチルベンジジン(TMB)が挙げられる。

【0043】本発明のプローブを使って、どのSSO プロ

ープが試料中に存在するHLA-DP配列に結合するかを調べることにより試料中に存在する対立遺伝子配列を同定することができる。SSOプローブと試料中の核酸配列との間で形成されたハイブリッドを検出する本発明の目的に適切なアッセイ方法は、当業界で既知である。例えば、実施例に記載するようなドットプロット方式を使って検出を行うことができる。

【0044】ドットプロット方式では、未標識の増幅された試料を膜に結合せしめ、その膜を適当なハイブリダイゼーション条件下で標識プローブと共にインキュベートし、ハイブリダイズしなかったプローブを洗浄により除去し、結合したプローブの存在についてフィルターをモニタリングする。少数のプローブを使って多数の試料を分析する時、好ましい方法は、完全に一致したハイブリッドのみが存在できるようにする高緊縮ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を必要とする。

【0045】別法は「逆」ドットプロット方式であり、この場合増幅された配列が標識を含む。この方式では、未標識のSSOプローブを膜に結合せしめ、そして適当な緊縮ハイブリダイゼーション条件下で標識された試料に暴露する。次いで適当に緊縮な条件下での洗浄によりハイブリダイズしなかったプローブを除去し、そして結合した配列の存在についてフィルターをモニタリングする。

【0046】「逆」ドットプロット方式の別の変形では、SSOプローブが標識され、試料核酸は未標識である。ハイブリダイゼーションと洗浄の後、標識プローブまたはプローブの標識断片を膜から遊離せしめ、試料中の配列が標識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたかどうかを検出する。標識の遊離は、二本鎖ハイブリッド中の制限部位を認識する制限酵素での消化により達成することができる。オリゴマー制限として知られるこの方法は、米国特許第4,683,194号および対応するEP特許公開第164,054号（これらの各々は参考により本明細書中に組み込まれる）に一層詳しく記載されている。

【0047】本発明のどのDP SSOプローブが試料中のDP配列にハイブリダイズするかを決定するどんな方法にせよ、DP-DNA型決定方法の主要な特徴は、SSOプローブのパネルの結合パターンを分析することによる試料中に存在するHLA-DP対立遺伝子の同定を含む。本発明の個々のプローブは確かに有用な情報を提供するために使用できるけれども、DPB1対立遺伝子中の変異は事実上分散され、そのため特定のDP変異体を独自に同定することができるいずれか1つのプローブはごくまれである。むしろ、実施例に示すように、対立遺伝子の同定はDPA1とDPB1遺伝子の異なるセグメントに特異的であるSSOプローブのパネルの結合パターンから推測される。

【0048】HLA-DP対立遺伝子のDNA型決定は、多数の異なる目的に、例えば、W0 89/11547と下記に詳細に記載される通り、或る種のHLA-DP対立遺伝子に関係づけられる自己免疫疾患への個体のかかりやすさを調べるために有用である。医学技術が発達するにつれて、グレーブス病、S.L.E.およびシェーグレン症候群を包含するますます多数の病気状態または病気傾向状態が種々のDP対立遺伝子に関連があると知られるようになるだろう。

【0049】本発明はそのような対立遺伝子を他の対立遺伝子から識別する方法を提供し、かくして自己免疫疾患の危険性が高い個体を同定する手段を提供する。好ましい態様では、まずPCR法を使ってHLA-DP遺伝子座の標的領域を増幅せしめることにより、かかりやすさを決定しようとする個体をHLA-DP型について分析する。次いで、増幅された標的領域にSSOプローブをハイブリダイズせしめ、そして増幅されたDNA中に存在する特定のDP対立遺伝子をSSOプローブの結合パターンから決定する。最後に、増幅されたDNA中に存在する対立遺伝子が自己免疫疾患に関係する対立遺伝子であるかどうかを決定する。

【0050】しかしながら、本発明の方法は、有意な恩恵を提供できるという点で医学の分野に限定されない。DNA型決定方法は、今や、個体を犯罪現場に残された証拠と結び付けることにより犯罪者または犠牲者の正体を確立する時のように犯罪を解明するためか、または生物学的材料を使って個体の実母または実父を確定する時のように非犯罪的性質の他の問題を解明するためかいずれにせよ、個体の同定の重要な領域で重要な役割を果たしている。よって、本発明はゲノム核酸を含む試料の起源に関する法医学的証拠を提供する方法にも関し、該方法は、前記試料のHLA DP遺伝子型と容疑者のHLA DP遺伝子型を決定し、前記容疑者のHLA DP遺伝子型と前記試料のHLA DP遺伝子型を比較し、そして前記試料が前記容疑者から誘導され得たかどうかを決定することを含んで成る。

【0051】本発明を使用する目的が何であれ、種々のDP対立遺伝子間の相違が本方法の成功の鍵である。DP対立遺伝子（並びにSXAおよびSXB偽対立遺伝子）の各々からのアミノ酸配列を配列表に与える。DPB1対立遺伝子のヌクレオチド配列が提供される。各対立遺伝子についての核酸配列およびアミノ酸配列の配列番号を下記に示す。DPB1対立遺伝子の各々に対して2つの同義の名称が与えられ；二番目はWHO命名委員会により与えられた公式名称である。

【0052】

【表17】

対立遺伝子	(WHO)	アミノ酸配列
DPA1	DPA1*0101	配列番号: 1
DPA2	DPA1*0201	配列番号: 2
SXA		配列番号: 3
SXB		配列番号: 4

[0053]

* * [表18]

対立遺伝子	核酸配列	アミノ酸配列
DPB1	DPB1*0101	配列番号: 5
DPB2.1	DPB1*0201	配列番号: 6
DPB2.2	DPB1*0202	配列番号: 7
DPB3	DPB1*0301	配列番号: 8
DPB4.1	DPB1*0401	配列番号: 9
DPB4.2	DPB1*0402	配列番号: 10
DPB5	DPB1*0501	配列番号: 11
DPB6	DPB1*0601	配列番号: 12
DPB8	DPB1*0801	配列番号: 13
DPB9	DPB1*0901	配列番号: 14
DPB10	DPB1*1001	配列番号: 15
DPB11	DPB1*1101	配列番号: 16
DPB13	DPB1*1301	配列番号: 17
DPB14	DPB1*1401	配列番号: 18
DPB15	DPB1*1501	配列番号: 19
DPB16	DPB1*1601	配列番号: 20
DPB17	DPB1*1701	配列番号: 21
DPB18	DPB1*1801	配列番号: 22
DPB19	DPB1*1901	配列番号: 23
DPB20	DPB1*2001	配列番号: 24
DPB21	DPB1*2801	配列番号: 25
DPB22	DPB1*3101	配列番号: 26
DPB23	DPB1*2701	配列番号: 27
DPB24	DPB1*3201	配列番号: 28
DPB25	DPB1*3301	配列番号: 29
DPB26	DPB1*3401	配列番号: 30
DPB27	DPB1*2901	配列番号: 31
DPB28	DPB1*3001	配列番号: 32
DPB29	DPB1*3501	配列番号: 33
DPB30	DPB1*2101	配列番号: 34
		配列番号: 35
		配列番号: 36
		配列番号: 37
		配列番号: 38
		配列番号: 39
		配列番号: 40
		配列番号: 41
		配列番号: 42
		配列番号: 43
		配列番号: 44
		配列番号: 45
		配列番号: 46
		配列番号: 47
		配列番号: 48
		配列番号: 49
		配列番号: 50
		配列番号: 51
		配列番号: 52
		配列番号: 53
		配列番号: 54
		配列番号: 55
		配列番号: 56
		配列番号: 57
		配列番号: 58
		配列番号: 59
		配列番号: 60
		配列番号: 61
		配列番号: 62
		配列番号: 63

【0054】上記に与えた配列情報は、容易な視覚的閲覧を可能にする形で下記のアミノ酸およびヌクレオチド配列整列表中に繰り返す。

【0055】DP対立遺伝子間の最も有意な相違は、それらの対立遺伝子によりコードされる種々のアミノ酸配列を整列しそして調査すると全く容易に検出することができる。そのような整列を下記に示す。

【0056】ここでダッシュ (—) はDPB4.1対立遺伝子(種々のDPB1対立遺伝子およびDPB1偽遺伝子については

SXB と指示する) との一致またはDPA1対立遺伝子(種々のDPA1対立遺伝子、DPA2、およびDPアルファ偽遺伝子についてはSXA と命名する) との一致を示す。この描写において、番号付けられた位置は成熟ペプチドサブユニットに対するもので、対立遺伝子の名称を左側に、そして代表的細胞源を右側に示す。

【0057】

[表19]

アルファ対立遺伝子

10 20 30 40 50 60 70 80
 DP1: DHVSTYAAASVQTHRPTGEFMFEDEDEMFYVDLKKETVWHLERFGQAFSPZAQGGLANIAILNNNTLIQRSNHHQTATN (LB)
 DP2: -----Q-----R-----A-
 SVA: E-S-Y-E-Q-N-E-M-P-P-IHT-D-G-R-I-G-VMAKHH--R-NG KQ-W-D (Daadi)
 ベー々々立選三子

ベータ対立遺伝子

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
DPB4.1	NYLFGQECYAFNCTQFLRYIYNREEFANEDSDVGEFRAVTELCBPAAEYNNSSQKDILFEKRAVDPDMCRHNYELGGPMTLQRR									(HHK)
DPB4.2	-----									(APD)
DPB2.1	-----					DE				(LB)
DPB2.2	-----					DE	E			
DPB8	-----					E	E			(OBL)
DPB5	-----					DE	E	V		(Plaz)
DPB3	-----					E				(HAS)
DPB6	VY-L					DE				(SLE)
DPB11	VY-L					DE	L	V		(JMS)
DPB13	VY-L					DE	L			(CRK)
DPB1	-----					Q Y	L	R		(BH)
DPB10	-----					Y	E	I		(LUT)
DPB9	VH-L					DE	E	V		(BHZ1)
DPB14	VH-L					DE	E	V		(TOK)
DPB15	VY					DE	L	V		(BZ68)
DPB16	-----					Q Y	L	R		(PLH)
DPB17	VH-L					DE	E			(JRA)
DPB18	VY					DE	E			(JRB)
DPB19	-----					DE				(JCA)
DPB20	-----					E	E	I		(CB68)
DPB21	VH-L					DE	L			
DPB22	-----					DE	L			
DPB23	VY-L					Y	L	L		
DPB24	-----									
DPB25	-----					V	DE	E		
DPB26	-----						E			
DPB27	VY-L					LV	L	L		
DPB28	VH-L					DE	L	E	V	
DPB29	VH-L					E	E			
DPB30	VY-L					DE				
DPB31	-----					LV	L			
DPB32	VY-E					YVH-A	L-M	IG-F	FM-R	EV-KV
DPB2 *	-----					YVGL				ME-LIR

【0058】しかしながら、実用的で且つ経済的な方式でDP対立遺伝子を検出および識別するためには、該対立遺伝子のヌクレオチド配列を知る必要がある。様々なDP A1およびDPB1対立遺伝子のヌクレオチド配列の一部を下記に示す。それらの配列は上記の如く同定される。本発明の例示的プライマーは8〜90コドンの配列を決定することができるDNAの製造を可能にする。本発明の種々

のプローブとのハイブリダイゼーションに好ましい標的配列である対立遺伝子配列の位置を〔-A-〕, 〔-B-〕, 〔-C-〕, 〔-D-〕, 〔-E-〕および〔-F-〕と指示する。

【0059】

【表 20】

	+10	+15	+20	+25
AsnTyrLeuPheGlnGlyArgGlnGlnCysTyrAlaPheAsnGlyThrGlnArgPheLeuGluArgTyr				
AGAAATTACCTTTCCAGGACGGCAGGAATGCTACCGGTTTAATGGGACACACGCGCTTCCTGGAGAGATAC				
DPB4.1:				
DPB4.2:				
DPB2.1:				
DPB2.2:				
DPB8:				
DPB7:				
DPB3:				
DPB6:				
DPB11:				
DPB13:				
DPB1:				
DPB9:				
DPB10:				
DPB14:				
DPB15:				
DPB16:				
DPB17:				
DPB18:				
DPB19:				
DPB20:				
DPB21:				
DPB22:				
DPB23:				
DPB24:				
DPB25:				
DPB26:				
DPB27:				
DPB28:				
DPB29:				
DPB30:				

[0060]

【表21】

【0 0 6 1】

【表 2 2】

【0 0 6 2】

【表 2 3】

	29		30
	+75	+80	+85
	AspArgMetCysArgHisAsnTyrGluLeuGlyGlyProMetThrLeuGlnArgArg		+90
DPB4.1:	GACAGGATGTGCAGACACAACACTACGAGCTGGGCGGGCCCATGACCCTGCAGCGCCGAG		
DPB4.2:	-----		
DPB2.1:	-----		
DPB2.2:	-----		
DPB8:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB5:	-----		A--A-G--G-----
DPB3:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB6:	-----		A--A-G--G-----
DPB11:	-----		A--A-G--G-----
DPB13:	-----A-----		A--A-G--G-----
DPB1:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB9:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB10:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB14:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB15:	-----		A--A-G--G-----
DPB16:	-----		T-----
DPB17:	-----		A--A-G--G-----
DPB18:	-----		A--A-G--G-----
DPB19:	-----A-----		T-----
DPB20:	-----		A--A-G--G-----
DPB21:	-----		A--A-G--G-----
DPB22:	-----		T-----
DPB23:	-----		A--A-G--G-----
DPB24:	-----		A--A-G--G-----
DPB25:	-----		-----
DPB26:	-----		T-----
DPB27:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB28:	-----		A--A-G--G-----
DPB29:	-----G-A-----		A--A-G--G-----
DPB30:	-----		A--A-G--G-----

|-E-|

|----F----|

【0063】上記に与えたDNA配列は本発明の重要な局面である。配列の一方の鎖のみが示されているけれども、当業者は上述の情報から該配列の他方の鎖を推定することができる。この情報は本発明のプロープの作製を可能にする。多数の本発明の例示的プロープを下記の実施例に示す。しかしながら、DPB1対立遺伝子のハイブリダイゼーション分析用の適当なプロープは或る種の多形性配列を含んで成る（またはそれに相補的である）だろう。

【0064】本発明の6セットの例示的プロープを下記に描写する。各セットはHLA-DPB1遺伝子の第二エクソンの特定領域における多形性間を識別するためにデザインされる。該領域の名称は上述した通りである。プロープがハイブリダイズするセグメント中の対立遺伝子変異体

内でコードされる多形性残基をプロープ配列の左側に1文字アミノ酸記号で示す（ダッシュはその位置に非多形性原型残基が存在することを意味する）。

【0065】それらのプロープは多形性アミノ酸残基をコードする領域に及び、約18ヌクレオチドの長さを有するものとして示される。多形性アミノ酸残基をコードし、従って指定のセグメントをコードする対立遺伝子を検出するためにプロープ内部に含まれていなければならないプロープ中のそれらの配列は、配列中の斜線記号（/）の間にある。プロープがハイブリダイズするであろうDP対立遺伝子をプロープの右側に示す。

【0066】

【表24】

アミノ酸エピトープHLA-DPB1 SSOプローブプローブ配列DPB1対立遺伝子

セグメントA:

LF-G: 配列番号: 64

TAC/CTTTTCAGGG/ACGG

2.1, 2.2, 4.1, 4.2, 5,
8, 16, 19, 21, 22,
24, 25, 26

VY-L: 配列番号: 65

TAC/GTGTTACCAGTT/ACGG

3, 6, 11, 13, 20, 23,
27, 30

VY-G: 配列番号: 66

TAC/GTGTTACCAGGG/ACGG

1, 15, 18

VH-L: 配列番号: 67

TAC/GTGCACCAGTT/ACGG

9, 10, 14, 17, 28, 29

セグメントB:

E-FA: 配列番号: 68

CGG/GAGGAGTTCGC/GCGC

4.1, 21, 22, 25

E-FV: 配列番号: 69

CGG/GAGGAGTTCGT/GCGC

2.1, 3, 4.2, 6, 8, 9,
10, 14, 16, 17, 18,
19, 20, 24, 27, 28, 29
2.2, 5, 26, 30

E-LV: 配列番号: 70

CGG/GAGGAGCTCGT/GCGC

11, 15

Q-YA: 配列番号: 71

CGG/CAGGAGTACGC/GCGC

1, 13, 23

E-YA: 配列番号: 72

CGG/GAGGAGTACGC/GCGC

セグメントC:

AAE: 配列番号: 74

CCTG/CTGCGGAG/TACTGG

1, 4.1, 11, 13, 15, 22,
23, 25, 26

DBE: 配列番号: 75

CCTG/ATGAGGAG/TACTGG

2.1, 4.2, 8, 10, 16, 18, 21

EAE: 配列番号: 76

CCTG/AGGCGGAG/TACTGG

2.2, 5, 19, 28, 30

DED: 配列番号: 77

CCTG/ATGAGGAG/TACTGG

3, 6, 9, 14, 17, 20, 27, 29

[0067]

* * [表25]

アミノ酸エピトープHLA-DPB1 SSOプローブプローブ配列DPB1対立遺伝子

セグメントD:

I-K: 配列番号: 78

GAC/ATCCTGGAGGAGAA/G

1, 4.1, 4.2, 5, 18, 23, 29

I-E: 配列番号: 79

GAC/ATCCTGGAGGAGGA/G

2.1, 2.2, 8, 9, 10, 13, 16,
17, 19, 24, 25, 28, 30

L-K: 配列番号: 80

GAC/CTCCTGGAGGAGAA/G

3, 14, 20, 21, 22, 26

L-E: 配列番号: 81

GAC/CTCCTGGAGGAGGA/G

6, 27

L-R: 配列番号: 82

GAC/CTCCTGGAGGAGAG/G

11, 15

セグメントE:

M: 配列番号: 83

GACAGG/ATG/TGCAGACAC

2.1, 2.2, 4.1, 4.2, 5, 6,
11, 15, 16, 17, 18, 20,
21-26, 28, 30

V: 配列番号: 84

GACAGG/GTA/TGCAGACAC

1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 14,
27, 29

I: 配列番号: 150

GACAGG/ATA/TGCAGACAC

13, 19

セグメントF:

GGPM: 配列番号: 85

CTGG/GCGGGCCCA/TGACC

2.1, 2.2, 4.1, 4.2, 24, 25

DEAV: 配列番号: 86

CTGG/ACGAGGCCG/TGACC

1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11,
13, 14, 16, 17, 19, 20,
22, 23, 27-30

VGPM: 配列番号: 87

CTGG/TCGGGCCCA/TGACC

15, 18, 21, 26

【0068】本発明のプローブはハイブリダイゼーションで使用する一本鎖であるため、プローブを例えばコード鎖とハイブリダイズするようにデザインする理由が、単に非コード鎖上に存在する相補的配列にハイブリダイ

ズするであろう同等に有用なプローブをデザインできなかったことを意味するのではないことは重要である。

【0069】上記に提供した配列情報も本発明の別の重要な局面に関する。本発明の好ましいプライマーは多数

の異なるDP対立遺伝子を増幅するためにデザインされる。多くの場合、下記の実施例で証明されるように、そのようなプライマーは非常に有用である。しかしながら、当業者は上記に与えられたDNA配列情報を使って対立遺伝子特異的増幅を可能にするであろうプライマーをデザインすることもできることを認識する。そのような対立遺伝子特異的プライマーは、単一の対立遺伝子または既知の対立遺伝子の或るサブセットのみを増幅せしめるだろう。例えば、本発明の"DEAV"プローブは、"DEAV"陽性DPB1対立遺伝子の対立遺伝子特異的増幅に備えるプライマーペアの1プライマーとして用いることができる。

【0070】本発明はまた、個体のHLA DP遺伝子型を決定するのに有用なキットにも関し、該キットはSSO プローブのパネルと、おそらく本発明の適当なプライマーを含んで成る。前記キットは、好ましくは、本法を実施するのに不可欠な成分を含んで成る多容器単位から成る。例えば、該キットは、本発明の好ましい態様ではプライマーが必要であるため、PCR用のプライマーを含有することができる。それらのプライマーは少なくともDPB1 30 遺伝子を増幅し、そして適宜、例えば法医学的分析においては、更にDPA1遺伝子も増幅するプライマーを含めることができる。

【0071】該キットは少なくともDPB1遺伝子のためのSSOプローブも含まなければならず、そして適宜、更にDPA1遺伝子のためのSSOプローブも含まれる。場合によって、SSOプローブがハイブリダイゼーション分析に有用である適当な支持体膜に固定化されてもよい。該キット内の容器中に含めることができる他の任意の成分としては、例えば、プライマー伸長生成物の合成を触媒する物質、基質ヌクレオシド三リン酸、標識するのに使う手段 30 (例えば、標識がビオチンであるならば、アビジン-酵素接合体と酵素基質と色素原)、およびPCRまたはハイブリダイゼーション反応用の適当な緩衝液が挙げられる。上記成分に加えて、該キットは本法を実施するための装置を含むこともできる。

【0072】単に例示目的であって本発明の範囲を限定するつもりで提供するのではない本発明の多数の実施例を下記に与える。特許請求の範囲内の本発明の多数の実施態様は、上記説明と下記実施例を読むことにより当業者 40 に明白であろう。下記実施例において、特記しない限り幾つかの技術は標準的である。そのような技術は感作リンパ球型決定(PLT)を含み、これは本質的にはShawら、1980、J. Exp. Med. 152:565-580により記載された通りに実施した。

【0073】一般に、リンパ球感作のために、応答細胞と刺激細胞を解凍し、洗浄し、グルタミンと抗生物質が補足されたRPMI-1640 培地(完全培地)中に再懸濁した。応答細胞を2:1の比で放射線照射された刺激細胞と混合し、そして細胞混合物を37℃で10日間インキュベートした。感作され照射された応答細胞を照射された刺激細胞と一緒に完全培地中で同時培養した。48時間後、³H-チミジンを培養物に添加した。18時間後に細胞を収得し、β崩壊をカウントすることによりトリチウムの取り込みを評価した。

【0074】DNA配列分析は、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)により記載された通りに実施した。一般に、分析しようとする配列をM13 クローニングベクター中にクローニングし、マキサム-ギルバート法またはジデオキシセクエンターミネーション法のいずれかにより分析した。合成オリゴヌクレオチド、両プライマーおよびプローブは市販の装置を使って合成した。合成技術は当業界で周知である。当業者は、必要であれば別の業者から代わりの試薬または装置を選択する立場にある。特記しない限り、下記に与える百分率はそれぞれwt/wt, vol/volおよびwt/volに基づく。

【0075】

実施例1: HLA-DP対立遺伝子のDNA配列の分析

DPA1遺伝子とDPB1遺伝子の種々の対立遺伝子の可変第二エクソンのDNA配列を決定した。使用するDNA試料は、できる限り広範囲のPLT限定DP対立遺伝子のスペクトルを表すように選択した。標準的な6つのDPw型について同型接合の細胞から、異常な型決定反応を示す細胞 30 から、およびDPブランク反応を示す細胞から、DNAを抽出した。DNA抽出は、Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manualに記載されたような標準技術によるものであった。

【0076】DPA1遺伝子とDPB1遺伝子の可変第二エクソンを、下記実施例2に記載の如くPCR法により増幅せしめた。増幅されたDNA配列をM13由来のベクター中にクローニングし、セクエンターミネーション法によりDNA配列を決定した。使用した細胞系、それらのDR血清型、それらのPLT 限定DPw型、およびそれらの細胞系 40 が含有することが判明したDNA限定対立遺伝子を表の形で下記に列挙する(ブランクはデータが決定されなかったことを意味する)。

【0077】

【表26】

セルライン	DR タイプ	DPw タイプ	DPB1 対立遺伝子	DPA1 対立遺伝子
CRK	7	1*	1, 11	
RS0101	w6	1, 3	1, 3	
BMG	4	1, 4	4.1	
QBL	3	2	2.2	1
WJR	2	2	2.1	
PJM	3	2, 3	2.1, 3	
RMD	5, w13	2, 4	2.1, 4.1	
JMOS	4, 5	2, 6	2.1, 6	
SLE	w13	3	3	1
COX	3	3	3	1
OPR	w8, w10	3, 4	3, 4.1	
JAH	4	3, 4	3, 4.1	
MRI	1, 2	3, 5	3, 5	
HHK	w6	4	4.1	
LB1	3, 7	4, MAS	1, 4.2	
APD	w6	4*	2, 4	
LUY	w8	1, 4	1, 4.1	1, 2
WDV	w6	2, 4	2.1, 4.1	
SMF	2, w12	4, 5	4.1, 5	
BCR	4, w6	4, 6	4.1, 6	
GTER	w8, 9	5	5	
HAS	4	5	5, 19	
DKY	9	5	2.1	1
BIN40	4	3, 6	3, 6	1
LG2	1	?	4.1	
PIAZ	2, 7		8	
TOK	2		9	2
BM21	w11		10	
VLA	2, 3		11	
GBA	1, 7		11	
CD1	3, 4	3, 6	10	
CD2	7, (5)	2, 4	4.2, 10	
CD8	3, 7	4	4.1, 4.2	
CD11		2	2.1, 4.2	

DP「MAS」はDPB 4.2 対立遺伝子に関連する新しく定義されたDP

特異性についての仮の名称。「CD」セルラインは実際にCD患者からのサンプルである。

* 異常なDPw 表現型を有する細胞に関する。

【0078】上記からわかるように、HLA-DP亜型のDNA分析は、特異的配列が既知のPLT限定DPw 型と関係があることを示し、このことは、感作T細胞により認識される多形性エピトープがDPB1鎖上にあることを指摘する。幾つかのDP型、例えばDPw2およびDPw4については、配列分析が亜型変異体を明らかにした。DPw2の変異体はDPB2.1およびDPB2.2と命名された。PLT についてDPw4 "new" (例えば LB1) またはDPw4* (例えば APD) と型決定された細胞は、珍しいDPB4.2亜型を含む。DPB4.2亜型は配列によるとDPB4.1対立遺伝子よりもDPB2.1に近く関連づけられる。個体CD11はDPw2と PLT型決定されるが、密接に関連したDPB2.1とDPB4.2対立遺伝子を含む。

【0079】上の結果はユニークDPB1配列がDPw1, DPw 50

3, DPw5およびDPw6特異性と一致し、それらの対立遺伝子がこの関係を反映するようにデザインされたことも示す。しかしながら、少ない例外は、細胞系DKY はDPw5と型決定されたがDPB2.1対立遺伝子を含むこと、および個体CD2 はDPw2と PLT型決定されるがDPB4.2とDPB10 対立遺伝子を含むことである。

【0080】実施例2：DPA1遺伝子およびDPB1遺伝子のPCR増幅のためのプライマー

実施例1に記載の細胞のうちの幾つかのDPA1遺伝子およびDPB1遺伝子をPCRにより増幅せしめた。使用したプライマー（合成）を、該プライマーが結合しそしてプライマー伸長のための鋳型として働くであろう遺伝子の領域と一緒に下記に示す。表に示されるように、左側のプ

37

ライマーGH98とDB01は上側の鎖から由来し、DNAポリメラーゼが右方向に伸長するように指令する。右側のプライマーGH99とDB03は下側の鎖から由来し、左方向に合成を指令する。小文字は、標的ゲノムDNA（反対鎖に示される）に相補的でないプライマー中の塩基を示す。

【0081】プライマー中のそれらの変化は、増幅されたDNAの末端に制限部位（BamHIまたはPstI）を組み入れ、増幅されたDNAのクローニングを容易にする。DPA1の第二エクソンの増幅に用いるオリゴヌクレオチドプライマーGH98とGH99は243bpセグメントを増幅する。PCR生成物の最初の2 bpは、該エクソンに隣接する介在配列からのものである。オリゴヌクレオチドプライマーDB01とDB03はDPB1の第二エクソンの294 bpセグメント*

アルファプライマー

```

----- GH98 -----> Phe Val Gln Thr His Arg Pro Thr ..
cGCGGAtCcTGtGTCAACTTATGCCGCG TTT GTA CAG ACG CAT AGA CCA ACA ..
TCGCCTGGTACACAGTTGAATACGGCGC AAA CAT GTC TGC GTA TCT GGT TGT ..

```

70

```

.. Leu Asn Asn Asn Leu Asn Thr Leu Ile
.. TTG AAC AAC AAC TTG AAT ACC TTG ATC CAGCGTTCCAACCACACTCAGGCCAC
.. AAC TTG TTG TTG AAC TTA TGG AAC TAG GTCGCAAGGTTGGTGTGAcgtCGGTc
<----- GH99 -----

```

ベータプライマー

```

----- DB01 -----> Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr ..
CagggatCCGCAGAGAATTAC CTT TTC CAG GGA CGG CAG GAA TGC TAC ..
GGGAGGGGCGTCTCTTAATG GAA AAG GTC CCT GCC GTC CTT ACG ATG ..

```

85

90

```

.. Glu Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln
.. GAG CTG GGC GGG CCC ATG ACC CTG CAG CGCCGAGGTGAGTGAGGGCTTTGG
.. CTC GAC CCG CCC GGG TAC TGG GAC GTC GCGGCTCCACTCACTgaCGtcctg
<----- DB03 -----

```

【0085】プライマーのハイブリダイゼーションと伸長されたプライマー含有生成物の合成は、本質的には欧州特許出願公開第 258,017号中およびPCRを実施するのに使った熱循環器の製造業者Perkin Elmer (Norwalk, CT)により提供されたプロトコール中に記載された通りであった。増幅は28サイクルであったが、更に多数、即ち35サイクルが良い結果をもたらすことができる。

【0086】DPB1対立遺伝子の第二エクソンを増幅するための別の2つのプライマー（UG19およびUG21と命名）は、上述したプライマーよりも効率的で且つ特異的であることが判明した。UG19およびUG20を使った増幅では、

38

*を増幅する。生成物の左側13 bp と右側17 bpは介在配列からのものである。プライマーが結合するゲノム配列を、配列表中に次の配列番号のもとに列挙する。

【0082】GH98が結合する領域——配列番号146

GH99が結合する領域——配列番号147

DB01が結合する領域——配列番号148

DB03が結合する領域——配列番号149

【0083】プライマーハイブリダイゼーション領域の間の領域の配列は、増幅される対立遺伝子に依存する。対立遺伝子配列は上記の配列番号のもとに配列表中に提供される。

【0084】

【表27】

15

10

15

50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.4)、1.5mM MgCl₂、10 0 μg/mlのゼラチン、各175 μM のdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、各0.5 μM の増幅プライマー並びに5.0 単位のTaq DNAポリメラーゼを含む 200 μl の反応液中で0.1 ~1 μg のゲノムDNAを増幅せしめた。増幅は、DNA熱循環器 (Perkin Elmer (Norwalk, CT)) 中で二段階温度サイクル（変性：95℃で30秒；アニーリングと伸長：65℃で30秒）を使って30サイクル実施した。

【0087】問題のDPA1プライマーとDPB1プライマーの配列を下記と配列表中に与える。

【表28】

DPA1プライマー

<u>プライマー</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
GH98	配列番号：140	CGCGGATCCTGTGTCAACTTATGCCGC
GH99	配列番号：141	CTGGCTGCAGTGTGTTGGAACGC

DPB1プライマー

<u>プライマー</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
DB01	配列番号：97	CAGGGATCCGCAGAGAATTAC
DB03	配列番号：98	GTCTGCAGTCACTCACCTCGGCG
UG19	配列番号：144	GCTGCAGGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT
UG21	配列番号：145	CGGATCCGGCCCAAGCCCTCACTC

【0088】実施例3：DPB1対立遺伝子のハイブリダイゼーション分析用のSSOプライマー

残りの実施例にわたり言及される本発明の代表的プローブを表の形で下記に記載する。この表には、プローブの名称、配列番号、プローブ配列（5'から3'方向）、並びにプローブがハイブリダイズする対立遺伝子の領域および該領域によりコードされる多形性アミノ酸配列が提供される。プローブは未標識のものとしてまたは³²Pもしくは「X」標識を有するものとしてのいずれかで示され、ここでXは下記実施例に記載されるようなHRPまたはビオチンを表す。

【0089】プローブ配列がXに続くプローブ名称によ

り表示される時、該プローブの配列は、³²P標識がHRP標識により置き換えられていること以外は、Xの後ろに指示されたプローブの配列と同じである。以後の実施例において論じられるように、該プローブは未標識プローブを膜に固定化せしめそして標識PCR生成物にハイブリダイズさせる逆ドットプロット方式において使用することもできる。未標識のものとして下記に示されるプローブは逆ドットプロット方式における使用のためにデザインされた。プローブ154と155は各々、配列中「N」と表示されるイノシン塩基を含む。

【0090】

【表29】

HLA-DPB1タイプ分けのためのSSO

	<u>プローブ</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
<u>領域A</u>			
LFQG	DB10	配列番号 : 99	³² P-GAATTACCTTTTCCAGGGA
	DB27	配列番号 : 99	X-DB10
	DB70	配列番号 : 119	X-GAATTACCTTTTCCAGGGAC
	DB136	配列番号 : 137	CCGTCCCTGGAAAAGGTAATC
VYQL	DB11	配列番号 : 100	³² P-ATTACGTGTACCAGTTACG
	DB23	配列番号 : 111	X-CGTAACGTGTACACGTAAT
	DB28	配列番号 : 100	X-DB11
	DB36	配列番号 : 111	X-DB23
VYQG	DB58	配列番号 : 114	X-ATTACGTGTACCAGTTA
	DB12	配列番号 : 101	³² P-CGTCCCTGGTACACGTAAT
	DB29	配列番号 : 101	X-DB12
	DB71	配列番号 : 120	X-TTACGTGTACCTGGGAC
VHQL	DB22	配列番号 : 110	³² P-ATTACGTGCACCAGTTACG
	DB35	配列番号 : 110	X-DB22
	DB117	配列番号 : 132	ATTACGTGCACCAGTTAC
	DB118	配列番号 : 133	ATTACGTGCACCAGTTA

領域B

EEFARF	AB117	配列番号 : 151	X-AGGAGTTCGCGCGCTT
EEFVRP	AB124	配列番号 : 152	X-AGGAGTTCGTGCGCTT
EELVRP	AB119	配列番号 : 153	X-AGGAGCTCGTGCCTTC
QEYARF	AB120	配列番号 : 154	X-CCGGCAGGAGTACGCGC
EEYARF	AB121	配列番号 : 155	X-GAGGAGTACGCGCGCT

[0091]

* * 【表30】

HLA-DPB1タイプ分けのためのSSO

	<u>プローブ</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
<u>領域C</u>			
AAE	DB13	配列番号 : 102	³² P-CCTGCTCGGAGTACTG
	DB30	配列番号 : 102	X-DB13
DBE	DB14	配列番号 : 103	³² P-CAGTACTCCTCATCAGG
	DB31	配列番号 : 103	X-DB14
	DB75	配列番号 : 124	X-CCTGATGAGGAGTACTG
	DB101	配列番号 : 131	CCAGTACTCCTCATCAGG
EAE	DB121	配列番号 : 134	CAGTACTCCTCATCAG
	DB16	配列番号 : 104	³² P-CAGTACTCCGCCTCAGG
	DB32	配列番号 : 104	X-DB16
	DB59	配列番号 : 115	X-CCTGAGGCGGAGTACTG
DED	DB17	配列番号 : 105	³² P-CCTGATGAGGACTACTG
	DB33	配列番号 : 105	X-DB17
DEV	DB122	配列番号 : 135	CTGATGAGGACTACTG
	AB112	配列番号 : 92	X-CCTGATGAGGTGTACTG

[0092]

【表31】

HLA-DPB1タイプ分けのためのSSO

	<u>プローブ</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
<u>領域D</u>			
I-K	DB18	配列番号: 106	³² P-GACATCCTGGAGGAGAAGC
	DB34	配列番号: 106	X-DB18
	DB72	配列番号: 121	X-ACATCCTGGAGGAGAAGC
I-E	DB19	配列番号: 107	³² P-GCTCCTCCTCCAGGATGTC
	DB37	配列番号: 107	X-DB19
	DB73	配列番号: 122	X-ACATCCTGGAGGAGGAGC
L-K	DB20	配列番号: 108	³² P-GACCTCCTGGAGGAGAAGC
	DB38	配列番号: 108	X-DB20
	DB74	配列番号: 123	X-ACCTCCTGGAGGAGAAGC
L-E	DB21	配列番号: 109	³² P-GCTCCTCCTCCAGGAGGTC
	DB39	配列番号: 109	X-DB21
	DB62	配列番号: 116	X-GACCTCCTGGAGGAGGAG
	DB92	配列番号: 127	X-GACCTCCTGGAGGAGGAGC
L-R	DB155	配列番号: 139	GACCTCCTGGAGNGAGGAGC
	DB63	配列番号: 117	X-GACCTCCTGGAGGAGAGG
	DB93	配列番号: 128	X-GACCTCCTGGAGGAGAGGC
	DB154	配列番号: 138	GACCTCCTGNGAGGAGAGGC

【0093】

20【表32】

HLA-DPB1タイプ分けのためのSSO

	<u>プローブ</u>	<u>配列番号</u>	<u>配列</u>
<u>領域E</u>			
M	AB96	配列番号: 88	TGTCTGCACATCCTGTCCG
V	AB97	配列番号: 89	TGTCTGCATACCTGTCCG
I	AB98	配列番号: 90	CGGACAGGATATGCAGACA
<u>領域F</u>			
<u>GGPM/VGPM</u>			
	DB25	配列番号: 122	³² P-CTGCAGGGTCATGGGCCCCCG
	DB40	配列番号: 112	X-DB25
	DB64	配列番号: 118	X-CTGGTCGGGCCCCATGACC
	DB76	配列番号: 125	X-CTGGGCGGGCCCCATG
	DB94	配列番号: 129	X-AGCTGGGCGGGCCCCATGAC
GGPM	AB122	配列番号: 156	X-CGAGCTGGGCGGGCCCCA
VGPM	AB123	配列番号: 157	X-CGAGCTGGTCGGGCCCCA
DEAV	DB26	配列番号: 113	³² P-CTGCAGGGTCACGGCCTCGTC
	DB41	配列番号: 113	X-DB26
	DB95	配列番号: 130	X-AGCTGGACGAGGCCGTGAC
	DB77	配列番号: 126	X-CTGGACGAGGCCGTG
"ALL"	DB123	配列番号: 136	X-CGCTTCGACAGCGACGT

【0094】上の表に関して、DB28はDB32と交差ハイブリダイズするため、DB28とDB32の代わりにそれぞれDB58とDB59を使うとより優れた結果を得ることができることに注目すべきである。加えて、プローブDB63はDB93よりも好ましい。HLA-DP型決定アッセイにおいて使用される特異的プローブパネルを下記の実施例において記載する。"ALL" プローブであるDB123は、領域Bのすぐ3'側の非可変配列に特異的であり、全てのDPB1対立遺伝子

配列にハイブリダイズする。それはハイブリダイゼーション反応におけるDPB1 DNAの量についての対照として有用である。

【0095】当業者は、使用する標識の種類および使用するハイブリダイゼーション方式に依存して、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が異なるであろうことを知っている。好ましい態様ではプローブが非同位体的に（例えばHRPまたはビオチンを使って）標識されるだ

ろうが、幾つかのプロープには同位体（例えば ^{32}P ）標識が使われた。ドットプロット方式で使用する ^{32}P 標識プロープまたはHRP標識プロープについてのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を下記に記載する。

【0096】そのような条件は経験的に決定された（Burgawan ら, 1988, J. Immunol. 141(12):4024-4030を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。表中、条件は5×デンハーツ溶液、0.5% SDS、および指定量（即ち 0.1×, 3×, 5×）のSSPEから成るハイブリダイゼーション溶液を仮定して言及した。5×デンハーツ溶液は、500 mlあたり0.5 g のフィコール、0.5 g のポリビニルピロリドン、0.5 g のBSA（Pen tax Fraction V）を含有する。

*

プロープハイブリダイゼーション／洗浄条件

プロープ	ハイブリダイゼーション洗浄条件
DB10	5×@50/42 水浴
DB27	5×@50/42 空気
DB11	3×@42/42 H ₂ O 空気
DB28	3×@55/42 水浴
DB58	3-5×@42/42 空気
DB23	5×@50/42 水浴
DB36	5×@50/42 空気
DB12	5×@50/42 水浴
DB29	5×@50/42 水浴
DB22	3×@50/42 水浴
DB35	3×@50/42 水浴
DB13	3×@50/42 水浴
DB30	3×@50/42 水浴
DB14	5×@42/42 水浴
DB31	5×@42/42 水浴
DB16	5×@42/42 水浴
DB32	3-5×@42/42 水浴
DB59	5×@50/42 水浴
DB17	5×@50/42 水浴
DB33	5×@50/42 空気
DB18	3×@55/42 水浴
DB34	3×@55/42 水浴
DB19	5×@55/42 水浴
DB37	5×@55/42 水浴
DB20	5×@55/42 水浴
DB38	5×@55/42 水浴
DB21	5×@50/42 水浴
DB39	5×@50/42 空気
DB62	3×@50/42 水浴
DB63	3×@50/42 水浴
DB25	5×@50/42 水浴
DB40	3×@50/42 水浴
DB26	5×@50/42 水浴
DB41	3×@50/42 水浴

【0099】塩化テトラメチルアンモニウム（TMACl）がハイブリダイゼーション溶液中に存在する時、プロープの区別はプロープの長さに基づくのであってプロープのG, C, AまたはT組成には関係ない。よって、ハイブリダイゼーション溶液中にTMACl を使うことにより、同じ長さの多数の異なるプロープを単一温度でハイブリダ

*【0097】洗浄溶液は0.1×SSPEと0.1% SDSを含有する（HRP標識プロープには、SDSの代わりに0.1% Triton X-100 を使用した）。洗浄段階は、水浴またはエアインキュベーターのいずれかの中で指摘の温度（摂氏度）において10分間実施する。下記に記載のように、塩化テトラメチルアンモニウムまたは同様な塩は、より均一なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件、即ち多数のプロープを1パネルにおいて使用して試料中のDP対立遺伝子の型を決定する時の好ましい条件を考慮に入れるために使われる。

【0098】

【表33】

イズせしめ洗浄することができる。

【0100】この目的に適当なハイブリダイゼーション溶液は、3M TMACl ; 0.5% SDS ; 10mM Tris-HCl, pH=7.5 および0.1mM EDTAを含有する。ハイブリダイゼーションは19マーのプロープDB27, DB28, DB29, DB35, DB34, DB37, DB38およびDB62については55℃にて、17マーのプ

ロープDB30, DB31, DB33およびDB59については50℃にて、そしてDB40およびDB41については60℃にて、30～60分間実施する。洗浄溶液は3M TMACL ; 50mM Tris-HCl, pH=8および2mM EDTAを含有する。洗浄は37℃で20分間、次いで高圧縮温度（ハイブリダイゼーション温度）で10分間実施する。

【0101】実施例4：DPA1対立遺伝子のハイブリダイゼーション分析用のSSO プローブ

DPA1対立遺伝子のハイブリダイゼーション分析用の適当なSSO プローブの例を下記に示す。2セットのプローブが例示され、各セットはHLA-DPA1遺伝子の第二エクソンの特異的断片中の多形性を識別するようにデザインされる。AS01とAS02は、それぞれメチオニン（M）（アミノ酸31）とグルタミン（Q）（アミノ酸50）を含む多形セグメントを含有する領域でDPA1対立遺伝子に結合する*

HLA-DPA1 SSOプローブ

プローブ	配列番号	配列	洗浄条件
AS01	配列番号：93	AGATGAGATGTTCTATG	2 x SSPE, 0.1% SDS, 42
AS02	配列番号：94	GTTTGGCCAAGCCTTTT	2 x SSPE, 0.1% SDS, 50
AS03	配列番号：95	AGATGAGCAGTTCTATG	2 x SSPE, 0.1% SDS, 50
AS04	配列番号：96	GTTTGGCCGAGCCTTTT	2 x SSPE, 0.1% SDS, 55

【0104】実施例5：SSO プローブとのハイブリダイゼーションによる増幅されたDPB1配列の分析

24のHTC（同型接合型決定用細胞）からのPCR増幅されたDPB1配列を、³²P-標識SSO プローブのパネル（n=9）を用いたドットプロット方式において分析し、プローブの結合パターンからDPB1型を推測した。細胞からのDNAの抽出は実施例1に記載された通りであった。細胞性ゲノムの標的領域、即ちDPB1遺伝子の第二エクソンを、実施例2に記載の如くプライマーDB01とDB03を使ってPCR技術により増幅せしめた。ただし、DNAが上記表に挙げた細胞からのDNAであった。この実験の時点では、現在既知のわずかに1サブセットの対立遺伝子しか知られていなかった。本発明の方法を使って追加の対立遺伝子が発見された。

【0105】増幅されたDNAをフィルター上にドットプロットした；各SSO プローブとのハイブリダイゼーションによる分析のために試料のパネルを含む別個のフィルターを調製した。試料をドットプロットするためには、0.4N NaOH と25mM EDTA を含む溶液 195μl で試料を希釈することにより各増幅試料5μl を変性せしめ、

*る。AS03とAS04は、それぞれグルタミン（アミノ酸31）とアルギニン（R）（アミノ酸50）を含む多形性セグメントを含有する領域でDPA2対立遺伝子に結合する。

【0102】AS02とAS04は、グルタミンを含む50位のところでアルギニンを含むものから多形性セグメントを識別する。それらのプローブは、それらの多形性アミノ酸残基をコードする領域に及ぶ。それらのプローブを使ったハイブリダイゼーションは、通常5×SSPE、5×デンハーツ溶液および0.5% SDSを含む溶液中で42℃にて少なくとも1時間実施する。それらのプローブを使う際の洗浄条件（温度は摂氏度）も示す。プローブ配列は5' から3' 方向で示される。

【0103】

【表34】

そしてまず9枚の複製Genatran 45 (Plasco, Woburn, Massachusetts) ナイロンフィルターを水で湿らせ、それらをドットプロット調製用のBio-dot (Bio-Rad, Richmond, CA) 装置中に入れ、試料をスポットし、そして各ウェルを0.4 mlの20×SSPE (3.6M NaCl, 200mM NaH₂PO₄および20mM EDTA)ですすいだ。フィルターを取り出し、2×SSPE中ですすぎ、そして真空オープン中で80℃にて30分間焼いた。

【0106】フィルター上の試料を本発明のSSO プローブとハイブリダイズせしめた。ハイブリダイゼーションは、2～5mlのハイブリダイゼーション溶液中0.25～0.5ピコモルのプローブを使って行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は実施例3に表の形で記載した通りであった。このDPB1型決定の結果を下記に示し、フィルター上の試料がハイブリダイズしたプローブおよび該プローブにより検出されたコードアミノ酸配列も示す。

【0107】

【表35】

DPベクターオリゴヌクレオチドプローブ													
セル ライン	HLA DR	HLA DPM	A			C			D			DPベクター 対立遺伝子 タイプ	
			DPI0	HLA DPM	HLA DPM	DBI1 VBL	DBI2 VBL	DBI3 AEE	DBI4 DEE	DBI7 DED	DBI8 I-K		DBI9 I-E
*1	COX	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
2	950	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
*3	BM21	11	-	-	-	+/ -	-	-	-	-	-	-	10
4	BM16	12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
5	BRIG	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
6	JVM	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
7	WT45	5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
8	MANN	6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
9	J640	7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	3
10	SLE	13	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
11	JMF	7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
12	BGE	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	4.1
13	BM14	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.1
14	BM92	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.2
15	TS10	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.1
16	RLO	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.1
*17	APD	6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.2
18	BUP	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.1/4.2
19	NMR	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.1
*20	LUV	8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1/4.1
21	YOS	4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4.2
*22	KDY	9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	2.1 (X H8)
23	BAS	5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	5
24	TOK	5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9

* DNA配列決定により構築されたセラルインDパペータタイプ、+/-は開いシグナルを示す。原文字cは、DB11プロープと交叉ハイブリダイズする(DB22プロープとはハイブリダイズしない)、残基VHYLをコードする領域A中の追加的多型性配列の存在を示す。原文字dは、DB10プロープ(セラルインBM92)により認識される配列に結合するDB11プロープの能力による、交叉ハイブリダイゼーション(セラルインBM92)により認識される配列に結合するDB11プロープの能力による、交叉ハイブリダイゼーションを示す。

【0108】SS0プローブを用いたハイブリダイゼーション分析に基づく細胞のDPB1型の決定については上で論じた。試料のDPB1型を決定するために、試料DNAへのプローブの結合を調べた。プローブの結合パターンから存在する対立遺伝子を推測した。例えば、試料1はSS0プローブDB11、DB17およびDB20とハイブリッドを形成した。DB11、DB17およびDB20によりコードされるアミノ酸はそれぞれVYQL、DEDおよびLEEKである。

【0109】DPB1対立遺伝子アミノ酸配列のセグメントA, CおよびDの調査は、配列VYQLがDPB3, DPB6, DPB11およびDPB13中に存在し;配列DEDがDPB17, DPB14, DPB12, DPB9, DPB6およびDPB3中に存在し;配列LEEX(L-K)がDPB14およびDPB3中に存在することを示す。プローブとハイブリダイズする3つの配列を含む唯一の対立

遺伝子（実験の時点では）はDPB3である。よって、SS0型決定に基づく試料1のDP型はDPB3である。

【0110】他の試料のDPB1型を同種の分析により推測し、決定された型を上表に叙述した。この表において、星印(＊)は配列分析によってもDPB1遺伝子型が決定された細胞を示す。細胞系 COXのDPB1型(以前w1→w3)およびBM21のDPB1型(以前w1→ブランク)は、指摘の型に最近変更された。記号 +/-は、プローブを使って弱いシグナルが得られたことを表す。幾つかの場合(BM21とTOK)、この弱いシグナルは、領域A中にアミノ酸残基VHQLをコードする追加の多形性配列(これがDB11プローブと交差ハイブリダイズする)が存在することを反映する。

【0111】該配列は、より便利には領域AブローブDB

22を使って型決定することができる。別の細胞系BM92については、DB10プローブにより認識される配列に対するDB11プローブのバックグラウンド交差ハイブリダイゼーションが明らかに存在する。同様な様式で、DB18プローブに相補的な配列に対してDB19プローブを用いると交差ハイブリダイゼーションシグナルが生じ得る。

【0112】この実施例で使用したSSOプローブのパネルは、5つの多形性領域のうちの3領域のみのところで変異を検出し、それら3領域の全ての対立遺伝子変異体を検出するわけではない。この実施例の手順を使った型決定方法は、単純で且つHTCに対して紛らわしくないが、種々のプローブのハイブリダイゼーションパターンが対立遺伝子のユニークペアより多いものとして解釈できる場合には、与えられた多形性のパッチワークパターンが曖昧な型決定を引き起こし得る。

【0113】この曖昧さは、異なるDPB1対立遺伝子を構成するDPB1配列変異体の多数の異なる組合せから生じる。しかしながら、本発明により提供される追加のSSOプローブ（この追加のプローブは残りの多形性領域に及ぶ）と、多分上述の対立遺伝子特異的増幅とを使用することによって、異型接合体について明確な型決定をすることができる。

【0114】実施例6：PCR増幅された標的領域のDNA配列分析によるセリアック病患者のHLA-DP型決定
セリアック病（CD）を有する4人の患者の細胞をPLT型決定し、そして実施例1に記載の通りにDPB1（第二エクソン）遺伝子の第二エクソンのDNA配列を決定した。CD診断は臨床症候学に基づいた。

【0115】CD細胞のDPB1のDNA配列決定により得られた分析結果は上記に記載してある。それらの結果から、CD細胞を非CD細胞と比較すると、DPB4.2対立遺伝子の頻度に明らかな増加があることが観察される。加えて、DPB10対立遺伝子配列は2人の無関係のCD患者に存在するが、非CD細胞系では30のうちのわずか1つに観察されるのみである。

【0116】実施例7：SSOプローブハイブリダイゼーション分析によるセリアック病患者のHLA-DP型決定
CDを有する19人の患者の細胞と43人の非CD対照の細胞をSSOプローブハイブリダイゼーション分析によりHLA-DP型について分析した。CDの診断は臨床症候学に基づいた。CD患者並びに対照の個体は全てイタリア出身であった。DNA抽出は実施例1に記載の通りであった。試料のPCR増幅は実施例2に記載の通りであった。増幅された配列の分析は実施例4に記載の通りであった。

【0117】分析結果は、非CD対照に比べてCD患者においてDPB4.2対立遺伝子に有意な増加が認められることを示した。この対立遺伝子はCD患者19人中12人に存在したが、対照患者では43人中3人へのみ存在した。DPB4.2とDPB3対立遺伝子は、CD患者19人中17人に存在し、対照患者では43人中15人に存在した。遺伝子型DPB4.1/4.2はCD

患者19人中10人に存在し、対照患者では43人中わずか1人へのみ存在した。

【0118】実施例8：法医学的試料のHLA-DP型決定
容疑者のゲノム核酸を含む試料を得る。ゲノムの標的領域、即ちDPA1およびDPB1遺伝子の第二エクソンを含む領域を実施例2に記載の通りPCR技術により増幅せしめる。ただし、前記実施例中の細胞の核酸を容疑者からの核酸に置き換え、そして増幅された試料は³²P標識を含む。同フィルター上にドットプロットされておりそしてポリdT末尾によりフィルターにより固定化されている本発明のプローブと増幅された試料とをハイブリダイゼーションせしめる。

【0119】固定化された配列特異的プローブの調製技術は国際特許出願公開第W0 89/11548号に記載されている。フィルターのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、完全に一致したハイブリッドだけを二本鎖状態のまま残すことを可能にする。フィルターを調べてどのプローブが標識試料とハイブリッドを形成するかを決定する。

【0120】容疑者から得られたものと比較しようとする試料を、同じ手順、即ちPCR増幅および固定化SSOプローブとのハイブリダイゼーションにより、DP型について調べる。容疑者からの試料のSSOプローブの結合パターンと比較試料の結合パターンを調査してハイブリダイゼーションパターンが同一か異なるかを決定する。

【0121】実施例9：西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたSSOプローブを使ったHLA-DP型決定
第二エクソン変異体用のSSOプローブを使って39人の個体からの細胞のパネルをDPB1対立遺伝子について型決定した。該プローブを西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識し、ハイブリッドをドットプロット方式で検出した。

【0122】分析する細胞は14人のIDDM患者、5人のDR3対照非IDDM患者、およびPLTによりDPブランクとして型決定された19人のHTCからのものであった。IDDM患者は臨床症候学により同定された。実施例1に記載の通り、細胞からDNAを抽出した。50mM Tris-HCl, pH 8.3; 2.5mM MgCl₂; 100μg/mlのゼラチン; 各0.75mMの4種のデオキシヌクレオシド三リン酸; プライマーDB01およびDB03; 並びにTaqポリメラーゼを含有する反応混合物200μl中で、PCR技術を使って、標的領域、即ちDPB1遺伝子の第二エクソンを増幅せしめた。

【0123】増幅温度循環プロフィールは次のようであった: 94℃への30秒間の加熱に次いでその温度での30秒間のインキュベーション; 55℃への1分間の冷却に次いでその温度での30秒間のインキュベーション; 72℃への30秒間の加熱に次いでその温度での45秒間のインキュベーション。この循環を42サイクル繰り返した。増幅後、反応混合物をサンプリングし、そして30%Nusieve, 1%アガロースを含むゲル上でのゲル電気泳動によりモニタ

リングしてDNA量が全て同等であるかどうかを調べた。

【0124】Genatranナイロン膜上に150 μ l/ドットの変性した増幅DNAをドットすることによりドットプロット試料を含むフィルターを調製し、そして試料を含むフィルターを5分間UV処理した。UV処理は試料を膜に固定するためである。0.4N NaOH と25mM EDTA を含む総容量 150 μ l においてPCR反応混合物 5 μ l を処理することにより、増幅DNAを変性せしめた。HRP標識されたSSOプローブを使ったハイブリダイゼーション用に8枚の複製フィルターを調製した。

【0125】ハイブリダイゼーション前に、試料を含むフィルターを、プローブ不含有の予備ハイブリダイゼーション溶液(1 \times SSPE、5 \times デンハーツ溶液、1% Triton X-100)中で15分間インキュベートした。この予備ハイブリダイゼーション溶液にはSDSの代わりにTriton X-100を使った。ハイブリダイゼーションは、1ピコモル/mlのプローブを更に含む同溶液中で実施した。

【0126】HRP 標識プローブのうちの1つを含む2.5 mlのハイブリダイゼーション溶液と共に各フィルターを40分間インキュベートした。使用したプローブはDB27, DB28, DB29, DB30, DB31, DB32, DB33およびDB35であった。プローブとハイブリダイゼーション条件は実施例3において表の形で列挙されている。ハイブリダイゼーション後、実施例3に記載の通り、適当な緊縮条件下で、即ち 0.1 \times SSPE、0.1% Triton X-100 中で42 $^{\circ}$ Cにて10分間フィルターを洗浄した。

【0127】HRP標識されたSSOプローブは、本質的には米国特許第 4,962,029号および同第 4,914,210号並びに対応する国際特許出願公開第 W0 89/02932号および同第W089/02931 号において開示された方法によって調製した。また、LevensonおよびChang, "Nonisotopically Labelled Probes and Primers", PCR Protocols 99-112 頁, Academic Press, 1990, M. Innis編も参照のこと。

【0128】それらの方法は本質的に、一方の末端にホスホルアミダイト成分を有しそして他方の末端に保護されたまたは未保護のスルフィドリル成分を有する親水性ポリマー鎖(例えばポリオキシエチレン)を含んで成る直鎖状連結分子を使って核酸プローブを誘導体化することを含む。前記ホスホルアミダイト成分は当業界で周知の反応(例えばBeaucageら, 1988, *Tetrahedron Lett.* *

*22:1859-1862)により核酸プローブに結合し、一方スルフィドリル基は、タンパク質、例えばHRP とジスルフィド結合または他の共有結合を自由に形成することができる。

【0129】米国特許第4,962,029 号および国際特許出願公開第 W0 89/02932号では、HRPはN-マレイミド-6-アミノカプロイル基を介して連結分子に接合される。該標識は、ジメチルホルムアミド中1当量のジシクロヘキシルカルボジイミドの存在下でN-マレイミド-6-アミノカプロン酸を4-ヒドロキシ-3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムでエステル化することにより調製する。

【0130】精製後、生成物を1:8のHRP対エステル比においてHRP含有リン酸緩衝液に添加する。オリゴヌクレオチドプローブをDNA合成装置中で合成し、そしてホスホルアミダイト合成条件を使って構造(C₆H₅)₃CS-(CH₂CH₂O)₄-P(CH₂CH₂CN) [N(i-Pr)₂] を有する連結分子を取りつける。トリチル基を除去し、HRP誘導体とプローブ誘導体と一緒に混合し、そして反応せしめて標識プローブを形成させる。同様な方法により、ビオチン標識されたプローブまたはプライマーを調製することもできる。

【0131】ハイブリダイズしたプローブを含む試料を、Sheldon ら, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9085-9089に記載されたような、TMB/H₂O₂を使用する発色反応を使って検出する。この検出系は国際特許出願公開第 W0 89/11548号に記載されている。増幅されたDNA試料のHLA-DP遺伝子型はフィルターから容易に明らかであった。

【0132】実施例10: HRP標識されたSSOプローブを使ったHLA-DPB1型決定

A. PCR増幅

DPB1型決定は14種以上のSSOプローブ(配列特異的オリゴヌクレオチド)を使うことができ、そのためDNAが限定していない場合、0.5~2 μ g のDNAに対して200 μ l の反応容量において増幅を行う。より少量のDNA、即ち100 ngを増幅せしめることができるが、そのような試料では一層多数のサイクル、即ち45サイクルの増幅を実施すべきである。

【0133】PCR反応は次の成分を1~2秒間渦動攪拌することにより出発する。

DNA	0.5 ~2 mg
10 \times Taq 緩衝液	20 μ l
100mM dNTPs	1.5 μ l
DPB1プライマー (10mM UG19 またはDB01)	10 μ l
DPB2プライマー (10mM UG21 またはDB03)	10 μ l
Taq ポリメラーゼ 5 U/ml	1.2 μ l

【0134】ガラス蒸留済H₂Oを加えて200 μ lの最終容量にする。10 \times Taq 塩は500mM KCl; 100mM Tris, pH 8.3; 15mM MgCl₂および1 mg/ml ゼラチンである。負の対照(即ちDNAなし)を各PCR反応に含めるべき

である。典型的には、Perkin Elmer (Norwalk, CT) DNA 熱循環器中での30~35サイクルの増幅で十分である。各サイクルは、96℃で30秒間の変性、および65℃で30秒間のアニーリングと伸長を行うように設計される。プライマーペアDB01/DB03を使う場合、アニーリングは55℃で30秒間であり、そして伸長は72℃で30秒間である。分析用ゲルを使ってPCRを確認し、ドットプロットに使用するDNAの量を定量することができる。

【0135】B. ドットプロット

典型的には、増幅されたDNA 5 μ l は、単一のドットプロットに十分な量より多い約 200 ng を含む。しかしながら、14ドット以上が要求されることがあり、即ちドットプロットを調製するのに約70 μ l の増幅反応液が使われることを覚えておいてほしい。各5 μ l の増幅反応液については、DNAに50 μ l の0.4N NaOH と25mM EDTA を添加する。DNAの変性を完結するのに5分間で十分である。Genatran膜をまず2 \times SSPEで湿らせ、次いで55 μ l の変性DNAをドットプロット装置に装入する。膜を2 \times SSPEですすぎ、UV光への5分間の暴露、即ちStratageneにより販売されているStratalinker 1800 TM UV光箱中での55 mJ/cm² 暴露により、DNAを膜に固定する。

【0136】C. ハイブリダイゼーション

膜を再び2 \times SSPEで湿らせ、そして8 \times 12 cm の膜 (ドットプロット装置のサイズ) あたり約5 ml のハイブリダイゼーション溶液を添加する。ハイブリダイゼーション溶液1 mlあたり約 1~1.5 ピコモルの HRPプローブを添加し、プローブを少なくとも1時間ハイブリダイズせしめる。ハイブリダイゼーション溶液はSSPE (前述)、5 \times デンハーツおよび1% Triton X-100 である。次いで膜を 0.1 \times SSPEおよび 0.2% Triton X-100 で10分間洗浄する。その他の点で、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は実施例3に記載した通りであった。使用したプローブはDB27, DB29, DB30, DB31, DB33, DB34, DB35, DB37, DB38, DB40, DB41, DB58, DB59, DB62およびDB63である。

【0137】D. 検出

次のプローブの検出段階は、適度の振盪と膜を完全に被覆するのに丁度足る溶液を使って、Bugawan ら, 1988, *Bio/Technology* 6:943-947 (これは参考として本明細書中に組み込まれる) に記載されたように室温で実施する。膜を緩衝液Bと共に5分間インキュベートし、緩衝液Cで5分間洗浄し、そして遮光下で緩衝液CとTMB (緩衝液C 48 mlと2 mg/ml のTMB 2.5 ml) と共に10分間インキュベートすることにより検出を行う。

【0138】緩衝液Bは 100 mM NaCl, 1 M尿素, 5% Triton X-100および1%硫酸デキストランである。緩衝液Cは 100 mM クエン酸ナトリウム, pH 5.0である。TMB は 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンである。50.5 ml の緩衝液C/TMB に23 μ l の3% H₂O₂ を添

加する。生じた溶液を使って遮光条件下で膜上に色を発色させる (発色は 1~15分間生じる)。少量の緩衝液Cを含むH₂O 中でフィルターを洗浄することにより発色を停止させる。緩衝液C洗浄を30分間2回繰り返す。膜の写真を取り、そして遮光下で膜を緩衝液C中に保存する。

【0139】ここに記載の方法並びに SS0プローブおよびプライマー並びにそれらを含むキットは、正確で、比較的単純で且つ経済的な個体のHLA-DP遺伝子型決定に有用である。正確なDP型決定は幾つかの医学用途に重要であると思われる。例えば、提供者と受容者の正確なHLA-DP型の一致は、同種移植片拒絶の防止や対宿主性移植片病の防止に役立つかもしれない。或る種のHLA-DP遺伝子型は或る種の自己免疫疾患 (例えばセリアック病、少数関節性JRA およびIDDMを含む) に関連するように思われるので、完全な臨床的症候が現れる前の前記病気の早期診断において有用かもしれない。

【0140】正確なHLA-DP型決定は法医学において有用である。例えば、それはゲノム核酸を含む試料、例えば血液、毛髪または精液が容疑者に由来するかどうかについての証拠を提供する。また個体の実父または実母を確定する際にも有用である。後者は歴史的試料を分析する際に特に重要である。

【0141】実施例11: 15プローブDPB1型決定アッセイ; ドットプロットおよび逆ドットプロット方式

ドットプロットおよび逆ドットプロットハイブリダイゼーションプロトコールは既に上記に記載してある。ここでは、各ハイブリダイゼーションプロトコールを使ったDPB1型決定アッセイを記載する。それらのアッセイは15個のプローブ、即ち領域A用4個、領域C用4個、領域D用5個そして領域F用2個を使用する。両プロトコールは、Bugawan ら, 1990, *Immunogenetics* 32:231-241 (これは参考として本明細書中に組み込まれる) に記載されたようなDPB1遺伝子座における型決定に好結果に利用されている。

【0142】A. ドットプロット

プライマーUG19とUG21を用いて、それらのプライマーについて実施例2に記載した増幅プロトコールを使って増幅を行う。ドットプロット方式では、増幅されたDNAを膜上に固定化する。約100 ngの増幅されたDNAを0.4N NaOH および25mM EDTA の溶液45 μ l 中で室温にて10分間変性せしめる。

【0143】膜 (Genetrans-45 (Pierce, Woburn, Massachusetts) またはBiodyne (Pall, Glen Cove, New York)) を2 \times 食塩-リン酸ナトリウム-EDTA (SSPE) または10mM Tris, 0.1mM EDTA 中で予め湿らせる。次いで、ドットプロット装置 (Biodot, BioRad, Richmond, California) を使って50 μ l の変性DNA試料を膜に適用する。Stratalinker (Stratagene, La Jolla, California) を使って50 mJ/cm² においてDNAを膜に紫外線

57

(UV) 架橋せしめる。予め湿らせるのに使ったのと同じ溶液中で膜を手短にすすぐことにより、未結合のDNAを除去する。

【0144】ハイブリダイゼーションは本質的には上記実施例に記載された通りに実施する。プローブおよびハイブリダイゼーション条件は下記に示される。2組のプローブとハイブリダイゼーションおよび洗浄条件とが示される。第一組はSSPE (指摘の濃度) および 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) のハイブリダイゼーション溶液を使用する。ハイブリダイゼーション溶液 1ml あたり 1 ピコモルのHRP 標識プローブを用いて振盪水浴中で (注釈が付けられた場合を除く) 指摘の温度 (摂氏度) で 30~60 分間ハイブリダイゼーションを行う (96 枚の試料フィルター当たり 8ml のハイブリダイゼーション溶液を使う)。次いでフィルターを 0.1×SSPE+0.1% SDS 中で指摘の温度で 10 分間洗浄することにより、未結合のプローブを除去する。

【0145】第二組のプローブおよびハイブリダイゼーション条件は、TAMC1 を使ったハイブリダイゼーション (実施例 3 に記載) のためのものである。上記と同様に *

58

* して 3M TAMC1, 0.5% SDS, 10mM Tris (pH 7.2) および 0.1mM EDTA 中で指摘の温度においてハイブリダイゼーションを行う。3M TAMC1, 50mM Tris (pH 7.2) および 2mMEDTA 中で 37℃ にて 10 分間、次いで指摘の緊縮温度にて 10 分間フィルターを洗浄することにより、未結合のプローブを除去する。

【0146】下表において、丸括弧内のプローブは、TAMC1 用のハイブリダイゼーション条件下で作業するためにデザインされたプローブである。第二のプローブが示されていない場合、指摘のプローブは SSPE と TAMC1 の両方のハイブリダイゼーション条件に使われる。全ての DPB1 プローブの配列は上記実施例と配列表中に提供されている。領域 B のすぐ 3' の非可変配列に特異的であり且つ全ての DPB1 対立遺伝子配列にハイブリダイズする 1 つのプローブ (DB123、配列番号 136、5' CGCTTCGACAGCGA CGT 3') も含まれる。この「All」プローブは、ハイブリダイゼーション反応における増幅された DPB1 DNA の量の対照として使われる。

【0147】

【表 36】

プローブ	SSPEハイブリダイ ゼーション濃度	ハイブリダイゼーション/ 洗浄温度 SSPE (℃)	TAMC1 (℃)
領域 A			
DB10	5 x	50/42	55/58
DB11 (DB58) *	3 x	42/42	52/58
DB12	5 x	50/42	55/58
DB22 (DB117)	3 x	50/42	55/58
領域 C			
DB13	3 x	50/42	55/58
DB14 (DB121)	5 x	42/42	55/58
DB59	5 x	50/42	55/58
DB17 (DB122) *	5 x	50/42	55/58
領域 D			
DB18 (DB72)	3 x	55/42	55/58
DB19 (DB73)	5 x	55/42	55/60
DB20	5 x	55/42	55/58
DB62	3 x	50/42	52/58
DB63	3 x	50/42	55/58
領域 F			
DB40	3 x	50/42	55/58
DB41	3 x	50/42	55/58
All			
DB123	3 x	50/42	55/58

* これらのプローブには振盪水浴の代わりにエアインキュベーターを使う。

【0148】固定化 DNA への HRP 標識プローブのハイブリダイゼーションは、過酸化水素の存在下で HRP により青色沈着物に変換される無色の可溶性基質テトラメチルベンジジン (TMB, Fluka, Ron Kon, Koma, New York) を使うことによって検出する。検出は適度な振盪下

で室温にて次のようにして行われる。洗浄後、膜を 1×ダルベッコのリン酸塩緩衝塩溶液中で 30 分間インキュベートし、次いで緩衝液 C (100mM クエン酸ナトリウム, pH 5) + 0.1 mg/ml TMB に移す。

【0149】0.0015% の最終濃度への過酸化水素の直接添加により TMB が沈殿し、1~5 分で青色沈殿として現れる。膜を 0.01×緩衝液 C に移すことにより反応を停止

させる。永久的記録のため、膜を写真撮影することができる。遮光下で緩衝液C中に個別に保存すれば、沈澱物は2か月に渡り安定である。あるいは、高感度の市販のECL遺伝子検出系キット (Amersham, Arlington Heights, Illinois) を使って、HRP標識プローブのハイブリダイゼーションを検出することができる。

【0150】B. 逆ドットプロット

逆ドットプロット方式では、プローブを膜に固定化しそしてビオチン化された増幅DNAにハイブリダイズせしめる。使用するプロトコールは本質的にはSaiki ら, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6215-6219に記載された通りである。

【0151】増幅は上記のドットプロットと同様に行われるが、ただし各プライマーはオリゴヌクレオチドの5'末端に結合された単一のビオチン分子を含む。下記に示す15のプローブに、ターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼまたは化学合成のいずれ*

逆ドットプロットプローブ

領域A	DB136, DB36, DB12, DB118
領域C	DB13, DB101, DB59, DB17
領域D	DB72, DB73, DB74, DB155, DB154
領域F	DB94, DB95
All	DB123

【0154】ハイブリダイゼーションのために、ビオチン化された増幅DNAを95℃にて5分間変性させ、次いで氷上で冷却する。50μlの変性DNAを、70μlの20 mg/mlストレプトアビジン-HRP 接合体 (Amplitype™, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey) と一緒に2.5 mlの予熱された (50℃) ハイブリダイゼーション溶液 (1×SSPE, 0.5% SDS) 中のフィルターに添加する。振盪水浴中で50℃にて30分間ハイブリダイゼーションを行う。振盪水浴中42℃において0.25×SSPE, 0.1% SDS中で10分間フィルターを洗浄することにより、未結合のプローブを除去する。ドットプロットアッセイと同様にハイブリダイゼーションを検出する。

【0155】実施例12: 25プローブDPB1型決定アッセイ 本質的には実施例11に記載の通りであるが、アミノ酸33~36 (領域B) の5つの異なるエピトープ用の5個の追加のプローブ、76位 (領域E) の3つの可変アミノ酸用の3個の追加のプローブ、およびアミノ酸84~87 (領域F) のGGPMおよびVGPMエピトープを区別するための2個の追加のプローブを含むように改変されたドットプロットDPB1型決定アッセイもデザインした。下記に示すプローブのセットは実施例11に記載のものと異なる。

*かを使ってポリT末尾を提供し、そして該プローブをフィルターに結合せしめる。それらの長さのため、末尾が優先的に膜に結合し、オリゴヌクレオチドプローブを自由にハイブリダイズできる状態にしておく。膜を1×SSPE, 0.5% SDS中で50℃にて少なくとも30分間洗浄することにより、未結合のプローブを除去する。

【0152】使用した15のプローブを、それらがハイブリダイズする遺伝子の領域に従ってグループ分けして下記に列挙する。検出される特異的アミノ酸エピトープは、上述のドットプロット方式で使用した15のプローブにより検出されたのと同じエピトープである。各プローブのハイブリダイゼーション領域の配列は上記実施例と配列表中に与えられる。上述した「All」プローブもここに含まれる。

【0153】

【表37】

【0156】しかしながら、探査される可変領域と検出される配列は、上述したように領域B用の5個のプローブ、領域E用の3個のプローブおよび領域F用の2個のプローブを追加すると同じである。実施例11と同様、対照として前記プローブのセット中に「All」プローブDB123が含まれる。それらの配列は上記実施例と配列表中に提供される。

【0157】ハイブリダイゼーションは本質的には前の実施例11に記載した通りに実施する。プローブハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を下表に示す。指摘の濃度のSSPEと0.5%のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) のハイブリダイゼーション溶液を使用する。注釈を加えた場合を除いて、振盪水浴中でハイブリダイゼーション溶液1 mlあたり2ピコモルの HRP標識プローブを使って (96-試料フィルターあたり8 mlのハイブリダイゼーション溶液を使う) 指摘の温度 (摂氏) において20~60分間ハイブリダイゼーションを行う。次いで下記に指摘の条件を使って0.1×SSPE+0.1% SDS中でフィルターを洗浄することにより、未結合のプローブを除去する。

【0158】

【表38】

61		62					
領域	プローブ	エピトープ	ハイブリダイゼーション 温度	溶液	洗浄温度	洗浄溶液	洗浄時間
A	DB27	LFQG	50℃	5 X	40℃ (air)	0.1X	10分
A	DB29	VYQG	50℃	5 X	42℃	0.1X	10分
A	DB35	VHQL	50℃	2 X	42℃	0.1X	15分
A	DB36	VYQL	42℃	2 X	42℃	0.1X	15分
B	AB117	EEFARF	55℃	5 X	50℃	0.1X	15分
B	AB119	EELVRF	50℃	5 X	50℃	0.1X	12分
B	AB120	QEYARF	50℃	3 X	50℃	0.1X	15分
B	AB121	EEYARF	55℃	1 X	50℃	0.1X	12分
B	AB124	EEPVRF	55℃	1 X	42℃	0.1X	15分
C	DB30	AAE	50℃	3 X	42℃	0.1X	15分
C	DB33	DEE	50℃	5 X	42℃	0.1X	10分
C	DB59	EAE	50℃	5 X	42℃	0.1X	10分
C	DB101	DEE	50℃	1 X	42℃	0.1X	10分
D	DB34	IK	55℃	2 X	42℃	0.1X	15分
D	DB37	IE	55℃	1 X	42℃	0.1X	15分
D	DB38	LK	55℃	1 X	42℃	0.1X	15分
D	DB62	LE	50℃	3 X	42℃	0.1X	15分
D	DB63	LR	55℃	2 X	42℃	0.1X	10分
E	AB96	M	42℃	1 X	50℃	0.2X	15分
E	AB97	V	42℃	2 X	50℃	0.2X	15分
E	AB98	I	42℃	2 X	50℃	0.4X	15分
F	DB77	DEAV	50℃	3 X	42℃	0.1X	10分
F	AB122	GGPM	55℃	3 X	55℃	0.1X	15分
F	AB123	VGPM	55℃	3 X	55℃	0.1X	15分
ALL	DB123	*ALL*	50℃	3 X	42℃	0.1X	10分

【0159】20個のみの対立遺伝子が存在することが知られていた時点で25プローブアッセイを使って幾つかの異なる集団中の対立遺伝子の多形性を特徴付けた。多数の試料が、以前には観察されなかった10個の対立遺伝子の存在を暗示するユニークなハイブリダイゼーションパターンを示した。それらの推定上の新規対立遺伝子をm13ベクター中にクローニングし、そして増幅プライマーUG21とAB111を使って、本質的には上記実施例に記載の通りに配列決定した。プライマーAB111は、クローニングを容易にするために5'末端にBamHI部位が付加されていること以外はプライマーUG19と同じである。UG19とUG21のヌクレオチド配列は上記実施例2と配列表中に提供される。AB111の配列は下記と配列表中に示される。

【0160】PCRベースのアッセイを使って形質転換体をDPB1第二エクソンの存在についてスクリーニングした。50mM KCl, 10mM Tris pH 8.3, 各200 μMのdNTP, *

プライマー	配列番号	配列
AB111	配列番号: 91	5'GGGATCCGAGAGTGGCGCCTCCGCTCAT
RS348	配列番号: 142	5'ACACAGGAAACAGCTATGACCATG
RS349	配列番号: 143	5'CCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC

【0163】10個の新規対立遺伝子、前記10個の新規対立遺伝子の各々が見つかる集団、および前記集団内の対立遺伝子頻度を下記の表に示す。各対立遺伝子に対して2つの名称が与えられる。第一はWHO命名委員会により与えられた公式名称であり、括弧内に示される第二の名称は同義名称である。それらの10個の対立遺伝子のヌ

*4mM MgCl₂, 2.5単位のTaqポリメラーゼ (Perkin Elmer, Norwalk, CT) 並びにm13クローニング部位に隣接する各20ピコモルのプライマーRS348 およびRS349 (配列は下記に示す) を含有する100 μlのPCR反応混合物中にピペットチップを使ってファージDNAを移した。

【0161】35サイクルの増幅 (95℃で1分間の変性、60℃で30秒間のアニーリング、72℃で30秒間の伸長) の後、3% Nusieve/1% Agaroseゲル上に5 μlのPCR生成物を適用し、そして³⁵S-dATPとシーケンナーゼ 2.0 (United States Biochemicals) を用いてジデオキシチエンターミネーション法により正しいサイズ (約400塩基対) のPCR生成物を生産するクローンを配列決定した。

【0162】

【表39】

クレオチド配列は上記対立遺伝子配列表と配列表中に示される。それらのヌクレオチド配列は、Genbankヌクレオチドデータベースに提出され、登録番号M84617~M84626を与えられている。

【0164】

【表40】

新しく発見された対立遺伝子

对立遗传子频度

対立遺伝子	集団	N/合計	小数値
DPB1*2801 (DPB21)	東南アジア人 インドネシア人	11/216 27/276	.05 .007
DPB1*3101 (DPB22)	東南アジア人 カンビネシア人	1/216 127/276 37/1284	.005 .043 .002
DPB1*2701 (DPB23)	ヒスパニック系米国人 アフリカ系米国人 ニグロ系米国人	2/200 4/292 1/268 27/1284	.01 .014 .004 .021
DPB1*3201 (DPB24)	ニューギニア人	1/268	.004
DPB1*3301 (DPB25)	ヒスパニック	1/200	.005
DPB1*3401 (DPB26)	ヒスパニック系米国人 メキシコ系米国人	1/200 1/200	.005 .005
DPB1*2901 (DPB27)	アフリカ系米国人 ニグロ系米国人 インドネシア人	1/200 3/268 1/276	.005 .011 .004
DPB1*3001 (DPB28)	アフリカ系米国人 ガンビネシア人 スーダン人	1/162 5/1284 8/?	.006 .004 ?
DPB1*3501 (DPB29)	ガンビネシア人 ボルトガル人	6/1284 1/?	.005 ?
DPB1*2101 (DPB30)	東南アジア人 オーストラリア系住民	10/216 1/34	.046 .029

【0165】前記対立遺伝子の大部分は、調査した集団中比較的小頻度（＜5％）であると思われる。全部ではないが2例、DPB1* 3201とDPB1* 3301の場合、各対立遺伝子は最小2人の無関係の個体中に見つかった。一般に、それらの10個の新規対立遺伝子は、前の実施例に記載した20個のDPB1対立遺伝子中に同定されたのと同じ多形性パッチワークパターンを示す。DPB1* 3201は、アミノ酸57を特定するコドン中に単一ヌクレオチド置換（A→T）を有し、この置換がこの位置にバリン残基を生ぜしめ、そして第三領域（領域C）の多様性に新規配列モチーフ（DEV）を与えるという点でユニークである。プローブ AB112（配列番号92）は、この新規配列モチーフを検出するためにデザインされる。AB112（配列番号92）の配列を下記に示す：

【0 1 6 6】

AB112 配列番号92 5' XCCTGATGAGGTGTACTG 3'
ここでXはHRP を示す。このプローブを使って様々な集団中のほぼ2,000 個体を型決定した。これまでのところ該プローブはDEV モチーフが見つかった最初の試料とのみハイブリダイズし、このことはそれがまれな変異体であることを示唆する。

【0167】2つの対立遺伝子DPB1* 3101とDPB1* 3401は、72位に単一アミノ酸変化(V→L)を引き起こすヌクレオチド241位に単一塩基置換(G→L)を有する。これはAからFまでと命名した6つの領域以外の多形性

領域の最初の例である。

【0168】このDPB1型決定アッセイは、25個の配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ、即ち領域A用の4個(LFQG, VYQL, VYQG, VHQL)、領域B用の5個(EEFARF, EELVRF, QEYARF, EEYARFおよびEEFVRF)、領域C用の4個(AAE, DEE, EAE, DED)、領域D用の5個(I-K, I-E, L-X, L-E, L-R)、領域E用の3個(M, V, I)そして領域F用の3個(GGPM, VGPM, DEAV)から成る。10個の新規対立遺伝子の発見前に知られていたものと20個のDPB1対立遺伝子を使うと、190の異型接合遺伝子型(20個の対立遺伝子を使うと210の可能な遺伝子型が存在し、そのうちの190が異型接合である)の6つをほとんど識別することができた。

【0169】本明細書に報告される10個の新規対立遺伝子の追加は、DPB1対立遺伝子の数を30に増やし、そして可能な遺伝子型の数を465に増やす。それらの新規対立遺伝子の追加は、幾つかの異型接合組合せが識別可能なプローブハイブリダイゼーションパターンを有し得るようなアッセイに更なる曖昧さを加えることになる。しかしながら、DEV モチーフ用のプローブ (AB112 一配列番号92) を加えた25プローブ型決定アッセイの使用により、9組の遺伝子型 (18の遺伝子型) がほとんど識別可能である。

【0170】より多数の集団の研究により、新規対立遺伝子が発見されることが予想される。本発明の方法は新

規対立遺伝子を検出するための手段を提供し、上述の対立遺伝子に限定されるものではない。本明細書に記載の方法により適当なプローブパネルを選択することによって迅速且つ正確なDPBI型決定が達成される。

【0171】

【配列表】

* 配列番号：1

配列の長さ：81

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：peptide

配列：

Asp	His	Val	Ser	Thr	Tyr	Ala	Ala	Phe	Val	Gln	Thr	His	Arg	Pro
1					5				10					15
Thr	Gly	Glu	Phe	Met	Phe	Glu	Phe	Asp	Glu	Asp	Glu	Met	Phe	Tyr
					20				25					30
Val	Asp	Leu	Asp	Lys	Lys	Glu	Thr	Val	Trp	His	Leu	Glu	Glu	Phe
					35				40					45
Gly	Gln	Ala	Phe	Ser	Phe	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Leu	Ala	Asn	Ile
					50				55					60
Ala	Ile	Leu	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ile	Gln	Arg	Ser	Asn
					65				70					75
His	Thr	Gln	Ala	Thr	Asn									
					80									

【0172】配列番号：2

配列の長さ：81

配列の型：アミノ酸

20※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：peptide

配列：

Asp	His	Val	Ser	Thr	Tyr	Ala	Ala	Phe	Val	Gln	Thr	His	Arg	Pro
1					5				10					15
Thr	Gly	Glu	Phe	Met	Phe	Glu	Phe	Asp	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Tyr
					20				25					30
Val	Asp	Leu	Asp	Lys	Lys	Glu	Thr	Val	Trp	His	Leu	Glu	Glu	Phe
					35				40					45
Gly	Arg	Ala	Phe	Ser	Phe	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Leu	Ala	Asn	Ile
					50				55					60
Ala	Ile	Leu	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Thr	Leu	Ile	Gln	Arg	Ser	Asn
					65				70					75
His	Thr	Gln	Ala	Ala	Asn									
					80									

【0173】配列番号：3

配列の長さ：80

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：peptide

配列：

Asp	His	Val	Ser	Thr	Tyr	Ala	Glu	Phe	Val	Gln	Thr	His	Arg	Pro
1					5				10					15
Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Phe	Glu	Phe	Asp	Glu	Glu	Glu	Gln	Phe	Tyr
					20				25					30
Val	Asn	Leu	Asp	Glu	Lys	Glu	Met	Val	Trp	Pro	Leu	Pro	Glu	Phe
					35				40					45
Ile	His	Thr	Phe	Asp	Phe	Gly	Ala	Gln	Arg	Gly	Ile	Ala	Gly	Ile
					50				55					60
Val	Met	Ala	Arg	Lys	His	Leu	Asn	Thr	Arg	Ile	Asn	Gly	Lys	Gln
					65				70					75

67

68

Thr Trp Ala Thr Asp

80

【0174】配列番号: 4

配列の長さ: 87

配列の型: アミノ酸

*鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: peptide

配列:

Asn	Ser	Val	Tyr	Gln	Glu	Arg	Gln	Glu	Cys	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly
1				5					10					15
Thr	Gln	Arg	Val	Val	Asp	Gly	Leu	Ile	Tyr	Asn	Arg	Glu	Glu	Tyr
				20					25					30
Val	His	Phe	Asp	Ala	Asp	Val	Gly	Glu	Leu	Arg	Ala	Met	Thr	Glu
				35					40					45
Leu	Gly	Arg	Pro	Ile	Gly	Glu	Tyr	Phe	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp	Phe
				50					55					60
Met	Glu	Arg	Lys	Arg	Ala	Glu	Val	Asp	Lys	Val	Cys	Arg	His	Lys
				65					70					75
Tyr	Glu	Leu	Met	Glu	Pro	Leu	Ile	Arg	Gln	Arg	Arg			
				80					85					

【0175】配列番号: 5

配列の長さ: 249

配列の型: 核酸

※鎖の数: 一本鎖

20 トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

GTGTACCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTACGCGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGCTGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGGTATGC AGACACAAC ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0176】配列番号: 6

配列の長さ: 83

配列の型: アミノ酸

★鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★30 配列の種類: peptide

配列:

Val	Tyr	Gln	Gly	Arg	Gln	Glu	Cys	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln
1				5					10					15
Arg	Phe	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Glu	Glu	Tyr	Ala	Arg
				20					25					30
Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gly
				35					40					45
Arg	Pro	Ala	Ala	Glu	Tyr	Trp	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile	Leu	Glu
				50					55					60
Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Asp	Arg	Val	Cys	Arg	His	Asn	Tyr	Glu
				65					70					75
Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Gln							
				80										

【0177】配列番号: 7

配列の長さ: 257

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: DNA (genomic)

配列:

AGAAITACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGTGCCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGCCCTG	150

69

70

ATGAGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GGAGCGGGCA 200
 GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACACT GAGCTGGGCG GGCCCATGAC 250
 CCTGCAG 257

【0178】配列番号：8

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：87

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

* 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe
 20 25 30
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
 50 55 60
 Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln Arg Arg
 80 85

【0179】配列番号：9

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT 50
 CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GCTCGTGCGC TTCGACAGCG 100
 ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGAGGCGGAG 150
 TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA 200
 CAGGATGTGC AGACACAAC ACGAGCTGGG CGGGCCCATG ACCCTGCAG 249

【0180】配列番号：10

30★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

★ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe
 20 25 30
 Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu
 50 55 60
 Leu Glu Glu Lys Arg Ala Leu Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
 80 85

【0181】配列番号：11

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGTACCACT TACGGCAGGA ATGCTACCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT 50

71

72

CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAC	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CCTCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGGTATGC AGACACAAC ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0182】配列番号：12

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

* 配列の種類：peptide

配列：

Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu	
50 55 60	
Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0183】配列番号：13

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：264

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGCGCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
CTGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GAAGCGGGCA	200
GTGCCGAGCA GGATGTGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGGCG GGCCCATGAC	250
CCTGCAGCGC CGAG	264

【0184】配列番号：14

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：87

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

★ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile	
50 55 60	
Leu Glu Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn	
65 70 75	
Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln Arg Arg	
80 85	

【0185】配列番号：15

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：256

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：DNA (genomic)

配列：

73

74

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGG CGGGCCCATG ACCCTGCAGC	250
GCCGAG	256

【0186】配列番号：16

* 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

* 配列の種類：peptide

配列：

Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln
1 5 10 15

Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg
20 25 30

Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly
35 40 45

Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu
50 55 60

Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu
65 70 75

Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln
80

【0187】配列番号：17

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GCTCGTGGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGAGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGA CGAGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0188】配列番号：18

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

★ 配列の種類：peptide

配列：

Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln
1 5 10 15

Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Leu Val Arg
20 25 30

Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly
35 40 45

Arg Pro Glu Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu
50 55 60

Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu
65 70 75

Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
80

【0189】配列番号：19

配列の型：核酸

配列の長さ：249

50 鎖の数：一本鎖

75

76

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGTACCACT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAC	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CCTCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAACCT ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0190】配列番号：20

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

※10 配列の種類：peptide

配列：

Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0191】配列番号：21

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGGTATGC AGACACAACCT ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0192】配列番号：22

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

☆ 配列の種類：peptide

配列：

Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0193】配列番号：23

配列の型：核酸

配列の長さ：249

50 鎖の数：一本鎖

77

78

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGCACCACT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTAAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAC	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTCCCAGA	200
CAGGGTATGC AGACACAAC TACGAGCTGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0194】配列番号：24

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

※10 配列の種類：peptide

配列：

Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0195】配列番号：25

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGCACCACT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTAAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTCCCAGA	200
CAGGGTATGC AGACACAAC TACGAGCTGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0196】配列番号：26

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

☆ 配列の種類：peptide

配列：

Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0197】配列番号：27

50 配列の長さ：249

配列の型：核酸

* トポロジー：直鎖状

鎖の数：一本鎖

* 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGTACCACT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGCAGGA GTACGCGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGAGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGCTGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CCTCCTGGAG GAGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAACCT ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0198】配列番号：28

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

10 トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

※ 配列の種類：peptide

配列：

Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Gln Glu Tyr Ala Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu	
50 55 60	
Glu Arg Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0199】配列番号：29

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：249

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGTACCACT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTACGCGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGAGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGCTGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATATGC AGACACAACCT ACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0200】配列番号：30

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：83

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

配列の種類：peptide

配列：

Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Ile Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

81

82

【0201】配列番号：31

配列の長さ：249

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGCACCAGT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAC	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CCTCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGGTATGC AGACACAAC TACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0202】配列番号：32

配列の長さ：83

配列の型：アミノ酸

10※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：peptide

配列：

Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu	
50 55 60	
Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0203】配列番号：33

配列の長さ：249

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

GTGTACCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGCAGGA GTACGCGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGAGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGCTGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CCTCCTGGAG GAGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGT CGGGCCCATG ACCCTGCAG	249

【0204】配列番号：34

配列の長さ：83

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：peptide

配列：

Val Tyr Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Gln Glu Tyr Ala Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu Leu Glu	
50 55 60	
Glu Arg Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Val Gly Pro Met Thr Leu Gln	
80	

【0205】配列番号: 35

配列の長さ: 249

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0206】配列番号: 36

配列の長さ: 83

配列の型: アミノ酸

10※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: peptide

配列:

Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

【0207】配列番号: 37

配列の長さ: 249

配列の型: 核酸

★鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

GTGCACCAGT TACGGCAGGA ATGCTACGCG TTTAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAC	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0208】配列番号: 38

配列の長さ: 83

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: peptide

配列:

Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80	

85

86

【0209】配列番号: 39

配列の長さ: 249

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

GTGTACCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTAAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGATGAGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGAAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATGTGC AGACACAAC TACGAGCTGGT CGGGCCCATG ACCCTGCAG	249

【0210】配列番号: 40

配列の長さ: 83

配列の型: アミノ酸

10※鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: peptide

配列:

Val Tyr Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Asp Glu Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Val Gly Pro Met Thr Leu Gln	
80	

【0211】配列番号: 41

配列の長さ: 249

配列の型: 核酸

★鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

CTTTCCAGG GACGGCAGGA ATGCTACGCG TTAAATGGGA CACAGCGCTT	50
CCTGGAGAGA TACATCTACA ACCGGGAGGA GTTCGTGCGC TTCGACAGCG	100
ACGTGGGGGA GTTCCGGGCG GTGACGGAGC TGGGGCGGCC TGAGGCGGAG	150
TACTGGAACA GCCAGAAGGA CATCCTGGAG GAGGAGCGGG CAGTGCCGGA	200
CAGGATATGC AGACACAAC TACGAGCTGGA CGAGGCCGTG ACCCTGCAG	249

【0212】配列番号: 42

配列の長さ: 83

配列の型: アミノ酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: peptide

配列:

Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Gln	
1 5 10 15	
Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe Val Arg	
20 25 30	
Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly	
35 40 45	
Arg Pro Glu Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile Leu Glu	
50 55 60	
Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Ile Cys Arg His Asn Tyr Glu	
65 70 75	
Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	

【0213】配列番号：43

配列の長さ：83

配列の型：アミノ酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：peptide

配列：

Val	His	Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Cys	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Thr	Gln
1				5					10				15	
Arg	Phe	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Glu	Glu	Phe	Val	Arg
				20					25				30	
Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gly
				35					40				45	
Arg	Pro	Asp	Glu	Asp	Tyr	Trp	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp	Leu	Leu	Glu
				50					55				60	
Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Asp	Arg	Met	Cys	Arg	His	Asn	Tyr	Glu
				65					70				75	
Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Leu	Gln							

【0214】配列番号：44

配列の長さ：257

配列の型：核酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※20 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGCGCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
ATGAGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGGA GAAGCGGGCA	200
GTGCGCGACA GGATGTGCAG ACACAACACTAC GAGCTGGTCG GGCCCATGAC	250
CCTGCAG	257

【0215】配列番号：45

配列の長さ：85

配列の型：アミノ酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★30 配列の種類：peptide

配列：

Asn	Tyr	Leu	Phe	Gln	Gly	Arg	Gln	Glu	Cys	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly
1				5					10				15	
Thr	Gln	Arg	Phe	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Glu	Glu	Phe
				20					25				30	
Ala	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Val	Gly	Glu	Phe	Arg	Ala	Val	Thr	Glu
				35					40				45	
Leu	Gly	Arg	Pro	Asp	Glu	Glu	Tyr	Trp	Asn	Ser	Gln	Lys	Asp	Leu
				50					55				60	
Leu	Glu	Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Pro	Asp	Arg	Met	Cys	Arg	His	Asn
				65					70				75	
Tyr	Glu	Leu	Val	Gly	Pro	Met	Thr	Leu	Gln					
				80					85					

【0216】配列番号：46

配列の長さ：257

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGCGCGCTT	100

89

90

CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG 150
 CTGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGGA GAAGCGGGCA 200
 TTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC 250
 CCTGCAG 257

【0217】配列番号：47

*鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

* 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe
 20 25 30
 Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu
 50 55 60
 Leu Glu Glu Lys Arg Ala Leu Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
 80 85

【0218】配列番号：48

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：257

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACCT GTACCAGTTA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA 50
 CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT ACGCGCGCTT 100
 CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG 150
 CTGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GAAGCGGGCA 200
 GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC 250
 CCTGCAG 257

【0219】配列番号：49

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

★ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
 50 55 60
 Leu Glu Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
 80 85

【0220】配列番号：50

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：257

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

50 配列の種類：DNA (genomic)

91

92

配列:

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGTCCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
ATGAGGTGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GGAGCGGGCA	200
GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGGCG GGCCCATGAC	250
CCTGCAG	257

【0221】配列番号: 51

*鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 85

トポロジー: 直鎖状

配列の型: アミノ酸

*10 配列の種類: peptide

配列:

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Asp Glu Val Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile	
50 55 60	
Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn	
65 70 75	
Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln	
80 85	

【0222】配列番号: 52

※鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 257

トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

※ 配列の種類: DNA (genomic)

配列:

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGCCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
CTGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GGAGCGGGCA	200
GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGGCG GGCCCATGAC	250
CCTGCAG	257

【0223】配列番号: 53

★鎖の数: 一本鎖

配列の長さ: 85

トポロジー: 直鎖状

配列の型: アミノ酸

★ 配列の種類: peptide

配列:

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile	
50 55 60	
Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn	
65 70 75	
Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Met Thr Leu Gln	
80 85	

【0224】配列番号: 54

50 配列の長さ: 257

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACCT TTTCCAGGGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGAGGAGC TCGTGCCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGAGT TCCGGCCGT GACGAGCTG GGGCGCCTG	150
CTGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGGA GAAGCGGCA	200
TTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGTCC GGGCCATGAC	250
CCTGCAG	257

【0225】配列番号：55

10※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

※ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Leu Phe Gln Gly Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Leu	
20 25 30	
Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu	
50 55 60	
Leu Glu Glu Lys Arg Ala Leu Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn	
65 70 75	
Tyr Glu Leu Val Gly Pro Met Thr Leu Gln	
80 85	

【0226】配列番号：56

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：257

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACGT GTACCAGTGA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGAGGAGT TCGTGCCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGAGT TCCGGCCGT GACGAGCTG GGGCGCCTG	150
ATGAGGACTA CTGGAACAGC CAGAAGGACC TCCTGGAGGA GGAGCGGCA	200
GTGCCGGACA GGGTATGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC	250
CCTGCAG	257

【0227】配列番号：57

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Val Tyr Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Leu	
50 55 60	
Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn	

95

96

65

70

75

Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln

80

85

【0228】配列番号：58

* 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：257

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACGT GCACCAGTTA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGTGCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
AGGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GGAGCGGGCA	200
GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC	250
CCTGCAG	257

【0229】配列番号：59

※ 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

※ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	
Leu Gly Arg Pro Glu Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile	
50 55 60	
Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn	
65 70 75	
Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln	
80 85	

【0230】配列番号：60

30★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：257

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACGT GCACCAGTTA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA	50
CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGT TCGTGCGCTT	100
CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG	150
ATGAGGACTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GAAGCGGGCA	200
GTGCCGGACA GGGTATGCAG ACACAACCTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC	250
CCTGCAG	257

【0231】配列番号：61

40 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：85

トポロジー：直鎖状

配列の型：アミノ酸

配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly	
1 5 10 15	
Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Phe	
20 25 30	
Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu	
35 40 45	

97

98

Leu Gly Arg Pro Asp Glu Asp Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
 50 55 60
 Leu Glu Glu Lys Arg Ala Val Pro Asp Arg Val Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
 80 85

【0232】配列番号：62

配列の長さ：257

配列の型：核酸

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：DNA (genomic)

配列：

AGAATTACGT GTCCCAGTTA CGGCAGGAAT GCTACGCGTT TAATGGGACA 50
 CAGCGCTTCC TGGAGAGATA CATCTACAAC CGGGAGGAGC TCGTGCCTT 100
 CGACAGCGAC GTGGGGGAGT TCCGGGCGGT GACGGAGCTG GGGCGGCCTG 150
 AGGCGGAGTA CTGGAACAGC CAGAAGGACA TCCTGGAGGA GGAGCGGCA 200
 GTGCCGGACA GGATGTGCAG ACACAACACTAC GAGCTGGACG AGGCCGTGAC 250
 CCTGCAG 257

【0233】配列番号：63

配列の長さ：85

配列の型：アミノ酸

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：peptide

配列：

Asn Tyr Val His Gln Leu Arg Gln Glu Cys Tyr Ala Phe Asn Gly
 1 5 10 15
 Thr Gln Arg Phe Leu Glu Arg Tyr Ile Tyr Asn Arg Glu Glu Leu
 20 25 30
 Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu
 35 40 45
 Leu Gly Arg Pro Glu Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln Lys Asp Ile
 50 55 60
 Leu Glu Glu Glu Arg Ala Val Pro Asp Arg Met Cys Arg His Asn
 65 70 75
 Tyr Glu Leu Asp Glu Ala Val Thr Leu Gln
 80 85

【0234】配列番号：64

配列の長さ：18

配列の型：核酸

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：genomic DNA

配列：

TACCTTTTCC AGGGACGG 18

【0235】配列番号：65

配列の長さ：18

配列の型：核酸

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆40 配列の種類：genomic DNA

配列：

TACGTGTACC AGTTACGG 18

【0236】配列番号：66

配列の長さ：18

配列の型：核酸

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：genomic DNA

配列：

TACGTGTACC AGGGACGG 18

【0237】配列番号：67

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：genomic DNA

99
配列：
TACGTGCACC AGTTACGG
【0238】配列番号：68
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGGAGGAGT TCGCGCGC
【0239】配列番号：69
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGGAGGAGT TCGTGC GC
【0240】配列番号：70
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGGAGGAGC TCGTGC GC
【0241】配列番号：71
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGCAGGAGT ACGCGCGC
【0242】配列番号：72
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGGAGGAGT ACGCGCGC
【0243】配列番号：73
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CGGGAGGAAT TCGTGC GC
【0244】配列番号：74
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CCTGCTGCGG AGTACTGG
【0245】配列番号：75
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CCTGATGAGG AGTACTGG
【0246】配列番号：76
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
CCTGAGGCGG AGTACTGG
【0247】配列番号：77
配列の長さ：18
配列の型：核酸

100
18
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
* 配列の種類：genomic DNA

18
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※10 配列の種類：genomic DNA

18
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：genomic DNA

18
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆20 配列の種類：genomic DNA

18
◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：genomic DNA

18
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
*30 配列の種類：genomic DNA

18
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：genomic DNA

18
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★40 配列の種類：genomic DNA

18
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：genomic DNA

18
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
50 配列の種類：genomic DNA

101
配列：
CCTGATGAGG ACTACTGG
【0248】配列番号：78
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACATCCTGG AGGAGAAG
【0249】配列番号：79
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACATCCTGG AGGAGGAG
【0250】配列番号：80
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACCTCCTGG AGGAGAAG
【0251】配列番号：81
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACCTCCTGG AGGAGGAG
【0252】配列番号：82
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACCTCCTGG AGGAGAGG
【0253】配列番号：83
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACAGGATGT GCAGACAC
【0254】配列番号：84
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
GACAGGGTAT GCAGACAC
【0255】配列番号：85
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
CTGGGCGGGC CCATGACC
【0256】配列番号：86
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
CTGGACGAGG CCGTGACC
【0257】配列番号：87
配列の長さ：18
配列の型：核酸

102
18
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
* 配列の種類：genomic DNA
18
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※10 配列の種類：genomic DNA
18
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：genomic DNA
18
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆20 配列の種類：genomic DNA
18
◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：genomic DNA
18
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
*30 配列の種類：genomic DNA
18
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：genomic DNA
18
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★40 配列の種類：genomic DNA
18
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：genomic DNA
18
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
50 配列の種類：genomic DNA

103	104
配列: CTGGTCGGGC CCATGACC	
【0258】配列番号: 88	18
配列の長さ: 19	* 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: TGCTGCACA TCCTGTCCG	* 配列の種類: genomic DNA
【0259】配列番号: 89	19
配列の長さ: 19	※ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: TGCTGCATA CCCTGTCCG	※10 配列の種類: genomic DNA
【0260】配列番号: 90	19
配列の長さ: 19	★ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: CGGACAGGAT ATGCAGACA	★ 配列の種類: genomic DNA
【0261】配列番号: 91	19
配列の長さ: 28	☆ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: GGGATCCGAG AGTGGCGCCT CCGCTCAT	☆20 配列の種類: genomic DNA
【0262】配列番号: 92	28
配列の長さ: 17	◆ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: CCTGATGAGG TGTA CTG	◆ 配列の種類: genomic DNA
【0263】配列番号: 93	17
配列の長さ: 17	* 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: AGATGAGATG TTCTATG	*30 配列の種類: genomic DNA
【0264】配列番号: 94	17
配列の長さ: 17	※ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: GTTTGGCCAA GCCTTTT	※ 配列の種類: genomic DNA
【0265】配列番号: 95	17
配列の長さ: 17	★ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: AGATGAGCAG TTCTATG	★40 配列の種類: genomic DNA
【0266】配列番号: 96	17
配列の長さ: 17	☆ 鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
配列: GTTTGGCCGA GCCTTTT	☆ 配列の種類: genomic DNA
【0267】配列番号: 97	17
配列の長さ: 21	鎖の数: 一本鎖
配列の型: 核酸	トポロジー: 直鎖状
	50 配列の種類: genomic DNA

105	106
配列: CAGGGATCCG CAGAGAATTA C	21
【0268】配列番号: 98	* 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	* 配列の種類: genomic DNA
配列: GTCCTGCAGT CACTCACCTC GGCG	24
【0269】配列番号: 99	※ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 19	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※10 配列の種類: genomic DNA
配列: GAATTACCTT TTCCAGGGA	19
【0270】配列番号: 100	★ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 19	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★ 配列の種類: genomic DNA
配列: ATTACGTGTA CCAGTTACG	19
【0271】配列番号: 101	☆ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 19	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆20 配列の種類: genomic DNA
配列: CGTCCCTGGT ACACGTAAT	19
【0272】配列番号: 102	◆ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	◆ 配列の種類: genomic DNA
配列: CCTGCTGCGG AGTACTG	17
【0273】配列番号: 103	* 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	*30 配列の種類: genomic DNA
配列: CAGTACTCCT CATCAGG	17
【0274】配列番号: 104	※ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※ 配列の種類: genomic DNA
配列: CAGTACTCCG CCTCAGG	17
【0275】配列番号: 105	★ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★40 配列の種類: genomic DNA
配列: CCTGATGAGG ACTACTG	17
【0276】配列番号: 106	☆ 鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 19	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆ 配列の種類: genomic DNA
配列: GACATCCTGG AGGAGAAGC	19
【0277】配列番号: 107	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 19	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	50 配列の種類: genomic DNA

107
配列：
GCTCCTCCTC CAGGATGTC
【0278】配列番号：108
配列の長さ：19
配列の型：核酸

配列：
GACCTCCTGG AGGAGAAGC
【0279】配列番号：109
配列の長さ：19
配列の型：核酸

配列：
GCTCCTCCTC CAGGAGGTC
【0280】配列番号：110
配列の長さ：19
配列の型：核酸

配列：
ATTACGTGCA CCAGTTACG
【0281】配列番号：111
配列の長さ：19
配列の型：核酸

配列：
CGTAACTGGT ACACGTAAT
【0282】配列番号：112
配列の長さ：21
配列の型：核酸

配列：
CTGCAGGGTC ATGGGCCCC G
【0283】配列番号：113
配列の長さ：21
配列の型：核酸

配列：
CTGCAGGGTC ACGGCCTCGT C
【0284】配列番号：114
配列の長さ：17
配列の型：核酸

配列：
ATTACGTGTA CCAGTTA
【0285】配列番号：115
配列の長さ：17
配列の型：核酸

配列：
CCTGAGGCGG AGTACTG
【0286】配列番号：116
配列の長さ：18
配列の型：核酸

配列：
GACCTCCTGG AGGAGGAG
【0287】配列番号：117
配列の長さ：18
配列の型：核酸

108
19
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
* 配列の種類：genomic DNA

19
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※10 配列の種類：genomic DNA

19
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：genomic DNA

19
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆20 配列の種類：genomic DNA

19
◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：genomic DNA

21
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
*30 配列の種類：genomic DNA

21
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：genomic DNA

17
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★40 配列の種類：genomic DNA

17
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：genomic DNA

18
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
50 配列の種類：genomic DNA

	(56)	特開平6-78800
109	110	
配列: GACCTCCTGG AGGAGAGG		18
【0288】配列番号:118	*鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:18	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	* 配列の種類:genomic DNA	
配列: CTGGTCGGGC CCATGACC		18
【0289】配列番号:119	※鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:20	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	※10 配列の種類:genomic DNA	
配列: GAATTACCTT TTCCAGGGAC		20
【0290】配列番号:120	★鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:17	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	★ 配列の種類:genomic DNA	
配列: TTACGTGTAC CTGGGAC		17
【0291】配列番号:121	☆鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:18	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	☆20 配列の種類:genomic DNA	
配列: ACATCCTGGA GGAGAAGC		18
【0292】配列番号:122	◆鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:18	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	◆ 配列の種類:genomic DNA	
配列: ACATCCTGGA GGAGGAGC		18
【0293】配列番号:123	*鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:18	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	*30 配列の種類:genomic DNA	
配列: ACCTCCTGGA GGAGAAGC		18
【0294】配列番号:124	※鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:17	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	※ 配列の種類:genomic DNA	
配列: CCTGATGAGG AGTACTG		17
【0295】配列番号:125	★鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:15	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	★40 配列の種類:genomic DNA	
配列: CTGGGCGGGC CCATG		15
【0296】配列番号:126	☆鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:15	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	☆ 配列の種類:genomic DNA	
配列: CTGGACGAGG CCGTG		15
【0297】配列番号:127	鎖の数:一本鎖	
配列の長さ:19	トポロジー:直鎖状	
配列の型:核酸	50 配列の種類:genomic DNA	

111
配列：
GACCTCCTGG AGGAGGAGC
【0298】配列番号：128
配列の長さ：19
配列の型：核酸
配列：
GACCTCCTGG AGGAGAGGC
【0299】配列番号：129
配列の長さ：19
配列の型：核酸
配列：
AGCTGGGCGG GCCCATGAC
【0300】配列番号：130
配列の長さ：19
配列の型：核酸
配列：
AGCTGGACGA GGCCGTGAC
【0301】配列番号：131
配列の長さ：19
配列の型：核酸
配列：
CCAGTACTCC TCATCAGGC
【0302】配列番号：132
配列の長さ：18
配列の型：核酸
配列：
ATTACGTGCA CCAGTTAC
【0303】配列番号：133
配列の長さ：17
配列の型：核酸
配列：
ATTACGTGCA CCAGTTA
【0304】配列番号：134
配列の長さ：16
配列の型：核酸
配列：
CAGTACTCCT CATCAG
【0305】配列番号：135
配列の長さ：16
配列の型：核酸
配列：
CAGATGAGGA CTA CTG
【0306】配列番号：136
配列の長さ：17
配列の型：核酸
配列：
CGCTTCGACA GCGACGT
【0307】配列番号：137
配列の長さ：22
配列の型：核酸

112
19
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
* 配列の種類：genomic DNA
19
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※10 配列の種類：genomic DNA
19
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★ 配列の種類：genomic DNA
19
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆20 配列の種類：genomic DNA
19
◆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
◆ 配列の種類：genomic DNA
18
*鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
*30 配列の種類：genomic DNA
17
※鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
※ 配列の種類：genomic DNA
16
★鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
★40 配列の種類：genomic DNA
16
☆鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
☆ 配列の種類：genomic DNA
17
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
50 配列の種類：genomic DNA

113	114
配列:	
CCGTCCCTGG AAAAGGTAAT TC	22
【0308】配列番号: 138	*鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	* 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GACCTCCTGN GAGGAGAGGC	20
【0309】配列番号: 139	※鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※10 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GACCTCCTGG AGNGAGGAGC	20
【0310】配列番号: 140	★鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 27	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CGCGGATCCT GTGTCAACTT ATGCCGC	27
【0311】配列番号: 141	☆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆20 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CTGGCTGCAG TGTGGTTGGA ACGC	24
【0312】配列番号: 142	◆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	◆ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATG	24
【0313】配列番号: 143	*鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 22	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	*30 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CCAGGGTTTT CCCAGTCAGC AC	22
【0314】配列番号: 144	※鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 28	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GCTGCAGGAG AGTGGCGCCT CCGCTCAT	28
【0315】配列番号: 145	★鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 25	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★40 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CGGATCCGGC CCAAAGCCCT CACTC	25
【0316】配列番号: 146	☆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 27	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GCGGCATAAG TTGACACATG GTCCGCT	27
【0317】配列番号: 147	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	50 配列の種類: genomic DNA

115	116
配列:	
CGGTTCCAAC CACTCAGG CCAC	24
【0318】配列番号: 148	*鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	* 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GTAATTCTCT GCGGGAGGG G	21
【0319】配列番号: 149	※鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※10 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CGCCGAGGTG AGTGAGGGCT TTGG	24
【0320】配列番号: 150	★鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 18	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GACAGGATAT GCAGACAC	18
【0321】配列番号: 151	☆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 16	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆20 配列の種類: genomic DNA
配列:	
AGGAGTTCGC GCGCTT	16
【0322】配列番号: 152	◆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 16	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	◆ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
AGGAGTTCGT GCGCTT	16
【0323】配列番号: 153	*鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	*30 配列の種類: genomic DNA
配列:	
AGGAGCTCGT GCGCTTC	17
【0324】配列番号: 154	※鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	※ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CCGGCAGGAG TACGCGC	17
【0325】配列番号: 155	★鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 16	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	★40 配列の種類: genomic DNA
配列:	
GAGGAGTACG CGCGCT	16
【0326】配列番号: 156	☆鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	☆ 配列の種類: genomic DNA
配列:	
CGAGCTGGGC GGGCCCA	17
【0327】配列番号: 157	鎖の数: 一本鎖
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖状
配列の型: 核酸	50 配列の種類: genomic DNA

117
配列：
CGAGCTGGTC GGGCCCA

118

17

フロントページの続き

(72)発明者 テオドリカ エル. プガワン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94579,
サン リーンドロ, ファリス ストリート
15524

(72)発明者 ヘンリー エー. アーリッヒ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94602,
オークランド, ローダ アベニュー 3936